

**LAPORAN
HIBAH KOMPETITIF PENELITIAN UNGGULAN STRATEGIS
NASIONAL BATCH I (RUSNAS 1 MILYARD) UNAIR
TAHUN ANGGARAN 2009**



**PENGEMBANGAN FITOFARMAKA OBAT MALARIA
DARI FRAKSI DITERPEN LAKTON HERBA SAMBILOTO
(*ANDROGRAPHOLIS PANICULATA* NEES)**

Ketua Peneliti :
Dr. ATY WIDYAWARUYANTI, MSi, Apt.

Anggota :
Dr. A. FUAD HAFID, MS, Apt
dr. INDAH TANTULAR, MKes., PhD.
Dra. LILIS DACHLIYATI
Dr. rer.nat. MULJA HADI SANTOSA

Dibiayai oleh Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat
Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi
Departemen Pendidikan Nasional
Surat Perjanjian DP2M Nomor : 416/SP2H/PP/Dp2M/V1/2009
Tanggal : 16 Juni 2009

KKB
KK-2
LP.213/10
Pen

LAPORAN
HIBAH KOMPETITIF PENELITIAN UNGGULAN STRATEGIS
NASIONAL BATCH I (RUSNAS 1 MILYARD) UNAIR
TAHUN ANGGARAN 2009



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

PENGEMBANGAN FITOFARMAKA OBAT MALARIA
DARI FRAKSI DITERPEN LAKTON HERBA SAMBILOTO
(*ANDROGRAPHOLIS PANICULATA* NEES)

Ketua Peneliti :
Dr. ATY WIDYAWARUYANTI, MSi, Apt.

Anggota :
Dr. A. FUAD HAFID, MS, Apt
dr. INDAH TANTULAR, MKes., PhD.
Dra. LILIS DACHLIYATI
Dr. rer.nat. MULJA HADI SANTOSA

Dibiayai oleh Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat
Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi
Departemen Pendidikan Nasional
Surat Perjanjian DP2M Nomor : 416/SP2H/PP/Dp2M/VI/2009
Tanggal : 16 Juni 2009

KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN

UNIVERSITAS AIRLANGGA

FACULTY OF PHARMACY

DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL CHEMISTRY

LABORATORY OF PHARMACEUTICAL CHEMISTRY

Jember, 15 October 2023

To: The Dean of the Faculty of Pharmacy

From: Aty Widya Waruyanti

Subject: Request for Approval of Thesis Title

I am writing to request your approval for the title of my thesis, which is: *Development of Phytochemicals...*

The title is: *Development of Phytochemicals...*

I have discussed this title with my advisor, and we have agreed on this title. I believe this title is appropriate for my research and will contribute to the field of pharmacy.

I kindly request your approval for this title. Thank you for your time and consideration.

Aty Widya Waruyanti



KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga dapat menyelesaikan segala rangkaian penelitian ini sampai pada penyelesaian laporan akhir. Pada kesempatan ini kami menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. DP2M Ditjen Dikti Depdiknas, yang telah memberikan dana dan mempercayakan pelaksanaan penelitian ini kepada kami.
2. Ketua Lembaga Penelitian dan Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan yang seluas-luasnya untuk dilakukannya penelitian ini.
3. Direktur Lembaga Penyakit Tropis Unair yang telah menyediakan fasilitas laboratorium dan kerjasama serta dukungan yang diberikan
4. Direktur PT. Kimia Farma Tbk. Atas dukungan fasilitas penelitian yang diberikan
5. Kepala Laboratorium Hewan Coba Universitas Airlangga yang sangat berperan pada fasilitas laboratorium dan hewan coba.
6. Kepala Departemen Farmakognosi dan Fitokimia Fakultas Farmasi Unair yang sangat membantu pelaksanaan penelitian ini .
7. Semua pihak yang tidak dapat kami sebutkan satu-persatu yang sangat berperan dalam keberhasilan penelitian ini.

Rasa terima kasih ini menyertai doa kami kepada Allah SWT, semoga budi baik dan jerih payah selama ini memperoleh manfaat yang sebanyak-banyaknya baik bagi diri sendiri maupun bagi keluarga dan Universitas Airlangga serta masyarakat pada umumnya.

Surabaya, Desember 2009

Penulis

RINGKASAN

Resistensi parasit terhadap obat antimalaria utama, klorokuin dan sulfadoksin-pirimetamin sampai saat ini masih merupakan hambatan utama dalam upaya penanggulangan malaria di dunia dan mendesak dilakukannya upaya-upaya untuk menemukan obat antimalaria baru dengan target yang berbeda dengan obat-obatan tersebut. Berbagai obat-obatan tradisional yang berasal dari tanaman atau bahan alam telah banyak digunakan di berbagai negara oleh etnik tertentu dan sangat potensial untuk diteliti lebih lanjut untuk mengungkap senyawa bioaktif yang mungkin terdapat di dalamnya.

Andrographis paniculata Nees, atau yang biasa dikenal dengan nama daerah sambiloto merupakan tanaman obat yang secara empiris digunakan sebagai antimalaria. Masyarakat Indonesia di Flores (NTT) diketahui menggunakan rebusan herba sambiloto untuk mengobati penderita malaria secara tradisional. Tanaman ini mempunyai kandungan senyawa golongan diterpen lakton dengan kandungan utama senyawa andrografolida, yang memiliki berbagai aktivitas farmakologis termasuk antimalaria. (Matsuda, 1994)

Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa herba sambiloto dengan kandungan utama senyawa diterpen lakton andrografolida berkhasiat sebagai obat antimalaria. Untuk memanfaatkan tanaman ini sebagai obat antimalaria, maka telah dilakukan penelitian untuk mengembangkan fraksi diterpen lakton (DTL) dari herba sambiloto ini sebagai sediaan farmasi dalam bentuk tablet yang aktif.

Penelitian dilakukan dalam dua tahun. Pada tahun pertama, akan dilakukan standarisasi proses pemisahan fraksi diterpen lakton dari ekstrak etanol sambiloto sebagai fraksi aktif antimalaria, pemilihan metode validasi penetapan kadar andrografolida (senyawa marker aktif) di dalam fraksi diterpen lakton sebagai salah satu parameter standarisasi fraksi. Pada tahun pertama ini, bekerja sama dengan divisi riset PT Kimia Farma akan dilakukan pengembangan produk fitofarmaka fraksi diterpen lakton yang aktif sebagai antimalaria. Juga dilakukan uji preklinik untuk mengetahui khasiat keamanan formula terpilih pada hewan coba. Pada tahun kedua bekerja sama dengan Lembaga Penyakit Tropis Unair, akan dilakukan uji klinik untuk mengetahui efektifitas dan keamanan produk fitofarmaka dari fraksi diterpen lakton sambiloto pada manusia.

Dari hasil penelitian tahun pertama ini, telah diperoleh metode fraksinasi yang paling optimal menghasilkan fraksi diterpen lakton dan dapat diterapkan dalam skala industri. Telah diperoleh fraksi diterpen lakton dari herba sambiloto, bentuk serbuk amorf, berwarna kuning kehijauan. Telah diperoleh metode yang valid untuk penetapan kadar marker dalam fraksi diterpen lakton sambiloto secara densitometri.

Hasil uji antimalaria *in vivo* menunjukkan bahwa fraksi diterpen lakton (DTL) sambiloto mempunyai aktivitas antimalaria terhadap parasit *P. berghei in vivo* dengan nilai $ED_{50} = 9,17$ mg/kg BB mencit. Aktivitas antimalaria DTL pada pemberian dosis tunggal (satu kali sehari) per orai dengan dosis 100 (66,41 %) dan 10 mg/kg BB mencit (56,45%) menunjukkan aktivitas yang tidak berbeda nyata meskipun dosis berbeda 10 kalinya. Sedangkan pada pemberian DTL dengan

dosis terbagi (10 mg sehari dua kali) menunjukkan aktivitas yang lebih kuat dan mampu menghambat parasit rata-rata 92,22 %.

Hasil studi pengembangan formula dispersi padat dari diterpen lakton menunjukkan bahwa formula III dengan komposisi fraksi diterpen lakton DTL-PEG 8000-PVPK30-Myrj52 (2 : 1 : 1 : 0.2) merupakan formula terpilih. Formula ini dibuat tablet (150mg/tablet) dengan komposisi serbuk dispersi padat DTL = 155,5 mg (77%), Avicel PH 102 = 33 mg (22 %), dan Mg stearat = 1,5 mg (1%) . Tablet dengan formula terpilih ini memiliki laju disolusi pada menit ke 15 = 28.21; pada menit ke-30 = 62.15; pada menit ke-60 = 68.12. Untuk kekerasan tablet formula III memiliki rentang 6.80-7.17 kP dan rata-rata 6.80 kP, dan untuk waktu disintegrasi tablet formula III adalah 12 menit 33 detik – 13 menit 05 detik.

SUMMARY

Parasite resistance to antimalarial drug, chloroquine and sulfadoxin-pirimetamin, still become major problem in malaria control worldwide, therefore, effort to develop new and different target antimalarial drugs is put in high priority. Several plants are used in traditional medicine for the treatment of malaria in many parts of world and very potential to further investigation of bioactive compounds from plant sources.

Andrographis paniculata Nees. Known as "sambiloto" is widely distributed in Indonesia has been traditionally used empirically for malarial remedies. Decoction of sambiloto's herb has been used traditionally to cure malaria by people in Flores (NTT-East Indonesia). Our preliminary test revealed that extract from *Andrographis paniculata* exhibit potent antimalarial activities againts *Plasmodium falciparum* *in vitro* and *Plasmodium berghei* *in vivo*. Andrographolide, a diterpene lactones compound of sambiloto is a major compound of this plant, which has various pharmacology activities including antimalarial.

Former research indicates that sambilot's herb with main compound of diterpene lactones andrographolide is effective as antimalarial, therefore, it is potential to be developed as antimalarial drugs. The traditionally used of sambiloto herbs become a problem to ensure the consistency of its efficacy, safety and effectivity. Therefore, the development of sambiloto's herbs through phytopharmaceutical product is very important. The development of phytopharmaceutical product require standardization of plant material. Standardization is a set of procedure and analysis method, that the result parameter is connected to pharmaceutical quality concept, fulfill chemical and biological standard and ensure the stability of product.

The present study aims to develop plant material of antimalarial phytopharmaceutical from standardized diterpene lactones fraction of *sambiloto* (*A. paniculata* Nees) with consistent chemical composition, and ensured consistency of its efficacy, safety and effectivity.

Research will be done in two years. In the first year, standardization of fractionation of diterpene lactones from ethanol extract of sambiloto as an active fraction of antimalarial, the selection of validation method of assay andrographolide (as active marker compound) in diterpene lactones fraction as one of standardization parameter of fraction, will be done. In this first year, the phytopharmaceutical product development of diterpene lactones study will be done by cooperates with research division of PT Kimia Farma. In the second year cooperated with The Institute of Tropical Disease of Unair, we will do preclinic study to know the effectivity and safety of the chosen formula using animal test. Also we will do clinical study to know effectivity and safety of phytopharmaceutical product from diterpene lactones fraction of sambiloto at human.

The result of research of this first year, has been obtained fractionation method which is most optimal yields diterpene lactones fraction and applicable in industrial scale. The amorphous powder, rust colored of greenness of diterpene lactones fraction of sambiloto has been obtained, also the valid method for

determined the marker compound of diterpene lactones fraction of sambiloto using TLC-densitometry.

This research revealed that diterpene lactones fraction (DTL) of sambiloto has antimalarial activity against parasite *P. berghei* in vivo with $ED_{50} = 9,17$ mg/kg BW. Antimalarial activity of DTL at single dose giving (once a day) per oral with dose 100 (66,41 %) and 10 mg/kg (56,45%) WB shows the same activity. While by giving multiple dose (twice a day) shows stronger activity and can pursue parasite of 92,22 %.

The study of formulation development on solid dispersion of diterpene lactones fraction shows that third formula, with below composition DTL-PEG 8000-PVPK30-Myrj52 (2 : 1 : 1 : 0.2) was the selected formula. The tablet of this formula (150mg/tablet) with composition : solid dispersion powder of DTL = 155,5 mg (77%), Avicel PH 102 = 33 mg (22 %), and Mg stearat = 1,5 mg (1%) This tablet showed dissolution rate at minutes 15th = 28.21; 30th = 62.15; and 60th = 68.12 respectively. Tablet hardness of the third formula has span between 6.80-7.17 kP and the average is 6.80 kP, the disintegration time of third formula formula III 12 minutes 33 seconds – 13 minutes 05 second.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
KATA PENGANTAR	iii
RINGKASAN	iv
SUMMARY	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Tinjauan Tentang Tanaman Sambiloto (<i>Andrographis paniculata</i> Nees).....	6
2.2. Studi Pendahuluan yang telah Dilakukan.....	7
BAB III BAHAN DAN METODE PENELITIAN	7
3.1. Bahan dan Alat yang Digunakan	7
3.2. Standarisasi Proses Produksi Fraksi Diterpen Lakton Sambiloto	7
3.3. Pengembangan Metode Validasi Penetapan Kadar Senyawa Aktif (andrografolida) di dalam Fraksi Diterpen Lakton dengan KLT-densitometri	7

3.3.1. Pengembangan Metode Validasi	7
3.3.2. Penetapan Kadar Andrografolida dalam Fraksi Diterpen Lakton yang Diperoleh dengan Berbagai Metode Pemisahan	9
3.3.3. Penetapan Profil Kromatogram KLT Densitometri dan KCKT	9
3.4. Pengembangan Formula Fraksi Diterpen Lakton yang Aktif sebagai Antimalaria	9
3.4.1. Studi Praformulasi.....	9
3.4.2. Pembuatan Massa Tablet Fraksi Diterpen Lakton	12
3.4.3 Penetapan Kadar Fraksi Diterpen Lakton Dalam Tablet.....	13
3.4.4. Uji Kekerasan dan Uji Disintegrasi Tablet Fraksi Diterpen Lakton.....	13
3.4.5. Penentuan Laju Disolusi Tablet Fraksi Diterpen Lakton	14
3.5. Uji Aktivitas Antimalaria dan Penentuan Dosis Efektif Formula Terpilih pada Mencit Terinfeksi Malaria	14
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....	16
4.1 Hasil Standarisasi Proses Ekstraksi Sambiloto untuk mendapatkan fraksi diterpen lakton (DL)	16
4.2 Proses produksi fraksi diterpen lakton menggunakan metode 5.....	19
4.3 Pengembangan metode validasi analisis kadar andrografolida dalam fraksi diterpen lakton sambiloto (<i>Andrographis paniculata</i> Nees. menggunakan densitometer.....	21

4.4 Hasil Uji Khasiat Antimalaria Fraksi Diterpen Lakton (DTL) Sambiloto	29
4.5. hasil studi Pengembangan Formula Dispersi Padat Fraksi Diterpen Lakton Sambiloto	33
4.5.1. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Fraksi Diterpen Lakton.....	33
4.5.2. Pembuatan Kurva Baku Fraksi Diterpen Lakton Dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis Pada panjang Gelombang Maksimum.....	34
4.5.3 Penentuan Kelarutan Fraksi Diterpen Lakton dalam Air.....	35
4.5.4 Penentuan Pengaruh Bahan Tambahan Terhadap Spektrum Fraksi Diterpen Lakton.....	36
4.5.5 Pembuatan Kurva Baku Fraksi Diterpen Lakton Dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis Pada Panjang Gelombang Derivat I Terpilih.....	37
4.4.6 Penetapan Kadar Fraksi Diterpen Lakton Dalam Tablet.....	38
4.4.7 Uji Kekerasan dan Uji Disintegrasi Tablet Fraksi Diterpen Lakton.....	38
4.4.8 Penentuan Laju Disolusi Tablet Fraksi Diterpen Lakton.....	39
BAB V PENUTUP	42
5.1 Kesimpulan.....	42
5.2 Saran.....	43
DAFTAR PUSTAKA	44
LAMPIRAN	47

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Herba Sambiloto (<i>Andrographis paniculata</i> Nees).....	6
Gambar 4.1	Hasil akhir fraksinasi.....	20
Gambar 4.2	Hasil akhir fraksinasi.....	20
Gambar 4.3	Proses ekstraksi.....	20
Gambar 4.4	Hasil akhir fraksinasi.....	20
Gambar 4.5	Proses pengadukan menggunakan stirer	21
Gambar 4.6	Profil spektrum puncak standar andrografolida pada Rf 0,48 (A) dan spektrum puncak andrografolida yang terdeteksi pada fraksi diterpen lakton sambiloto pada Rf 0,48 (B) menggunakan Densitometer pada lempeng KLT Silika F254, eluasi dengan kloroform-metanol (9:1 v/v) dan panjang gelombang maksimum 231 nm.....	22
Gambar 4.7	Kurva regresi linier antara jumlah standar andrografolida yang ditotolkan (μg) terhadap luas area puncak pada studi linearitas menggunakan Densitometer pada lempeng KLT Silika F254, eluasi dengan kloroform-metanol (9:1 v/v) dan panjang gelombang maksimum 231 nm.....	23
Gambar 4.8	Kurva regresi linier antara jumlah standar andrografolida yang ditotolkan (μg) terhadap luas area puncak pada studi penentuan LOD dan LOQ menggunakan Densitometer pada lempeng KLT Silika F254, eluasi dengan kloroform-metanol (9:1 v/v) dan panjang gelombang maksimum 231 nm.....	24
Gambar 4.9	Profil kromatogram standar andrografolida dan fraksi diterpen lakton sambiloto pada studi penentuan linearitas, akurasi dan presisi menggunakan Densitometer pada lempeng KLT Silika F254, eluasi dengan kloroform-metanol (9:1 v/v) dan panjang gelombang maksimum 231 nm.....	26

Gambar 4.10	Spektra Larutan Fraksi Diterpen Lakton Ekstrak Sambiloto Kadar 4.2; 8.4 dan 16.8 ppm pada panjang gelombang 200-400 nm.....	33
Gambar 4.11	Kurva Hubungan Antara Kadar Fraksi Diterpen Lakton Ekstrak Sambiloto (ppm) dan Absorban pada $\lambda = 225.05$ nm.....	34
Gambar 4.12	Kurva Hasil Uji Kelarutan Fraksi Diterpen Lakton Ekstrak Sambiloto Dengan Pelarut Aquadest Pada Suhu 30°C.....	35
Gambar 4.13	Spektra Pengaruh PVP K-30, PEG 8000 dan Myrj 52 terhadap Spektrum Fraksi Diterpen Lakton.....	36
Gambar 4.14	Spektra Derivat I Pengaruh PVP K-30, PEG 8000 dan Myrj 52 terhadap Spektrum Fraksi Diterpen Lakton.....	36
Gambar 4.15	Kurva Hubungan Antara Kadar Fraksi Diterpen Lakton Ekstrak Sambiloto (ppm) dan Absorban pada $\lambda = 225.05$ nm.....	37
Gambar 4.16	Profil Laju Disolusi Tablet Dispersi Padat Fraksi Diterpen Lakton.....	40

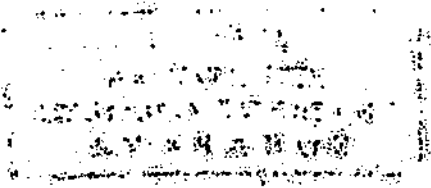
DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel III.1	Formula Optimasi Dispersi Padat Fraksi Diterpen Lakton Ekstrak Sambiloto..... 12
Tabel III.2	Komposisi Formula Tablet Oral dengan Fraksi Diterpen Lakton 1313
Tabel IV.1	Perbandingan antar metode ekstraksi..... 19
Tabel IV.2	Luas area puncak yang diperoleh pada penotolan berbagai jumlah standar andrografolida pada studi linearitas menggunakan Densitometer..... 22
Tabel IV.3	Luas Area Puncak yang Diperoleh pada Penotolan Berbagai Jumlah Standart Andrografolida pada Studi Penentuan LOD dan LOQ Menggunakan Densitometer..... 24
Tabel IV.4	Luas Area Puncak yang Diperoleh pada Penotolan Berbagai Jumlah Standart Andrografolida, fraksi Diterpen Lakton yang ditambah standart pada Studi Penentuan Akurasi Menggunakan Densitometer 25
Tabel IV.5	Luas Area Puncak yang Diperoleh pada Penotolan Berbagai Jumlah Standart Andrografolida, fraksi Diterpen Lakton dengan 6 kali Replikasi pada Studi Penentuan Akurasi Menggunakan Densitometer..... 26
Tabel IV.6	Luas Area Puncak yang Diperoleh pada Penotolan Fraksi Diterpen Lakton dengan Tiga Kali Replikasi pada Studi Penentuan Kadar Andrografolida dalam Fraksi Diterpen Lakton Menggunakan KLT Densitometri 27
Tabel IV.7	Persen Parasetimia Persen Pertumbuhan, Persen Penghambatan dan Persen Penghambatan Rata-rata Fraksi DTL Sambiloto Pemberian Dosis Tunggal..... 29

Tabel IV.8	Persen Parasetimia Persen Pertumbuhan, Persen Penghambatan dan Persen Penghambatan Rata-rata Fraksi DTL Sambiloto Pemberian Dosis Ganda.....	29
Tabel IV.9	Analisis Varians.....	30
Tabel IV.10	Data HSD dari % Penghambatan terhadap Pertumbuhan Parasit Malaria antar Kelompok.....	31
Tabel IV.11	Analisis Varians.....	32
Tabel IV.12	Data HSD dari % Penghambatan terhadap Pertumbuhan Parasit Malaria antar Kelompok.....	32
Tabel IV.13	Nilai Absorbansi Larutan Fraksi Diterpen Lakton Ekstrak Sambiloto Kadar 4.2; 8.4 dan 16.8 ppm.....	33
Tabel IV.14	Hasil Pengukuran Absorbansi Larutan Baku Fraksi Diterpen Lakton Pada λ 225.05 nm.....	34
Tabel IV.15	Hasil Uji Kelarutan Fraksi Diterpen Lakton Ekstrak Sambiloto Dengan Pelarut Aquadest Pada Suhu 30⁰C.....	35
Tabel IV.16	Hasil Pengukuran Absorbansi Larutan Baku Fraksi Diterpen Lakton Pada λ 246.98 nm.....	37
Tabel IV.17	Hasil Penetapan Kadar Fraksi Diterpen Lakton Dalam Tablet Dispersi Padat.....	38
Tabel IV.18	Hasil Pemeriksaan Kekerasan Tablet Fraksi Diterpen Lakton Ekstrak Sambiloto.....	38
Tabel IV.19	Waktu Disintegrasi Tablet Dispersi Padat Fraksi Diterpen Lakton.....	39
Tabel IV.20	Rata-Rata Persen Fraksi Diterpen Lakton Terlarut Dari Tablet Dispersi Padat Fraksi Diterpen Lakton.....	39
Tabel IV.21	Efisiensi Disolusi Fraksi Diterpen Lakton Dari Tablet Dispersi Padat Fraksi Diterpen Lakton Pada Waktu 15, 30 dan 60 menit.....	40

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman	
Lampiran 1	Cara perhitungan V_{xo} dan X_p pada studi linearitas dan penentuan LOD dan LOQ.....	47
Lampiran 2	Data Probit Analisa Fraksi Diterpen Lakton (DTL) Sambiloto.....	48
Lampiran 3	Analisa Anova Uji Invivo Fraksi DTL Sambiloto Pemberian Dosis Tunggal	51
Lampiran 4	Peralatan yang digunakan dan Personalia peneliti	52



Illegible text, possibly a title or abstract, located in the upper middle section of the page.

BAB I

Pendahuluan



1.1. Latar Belakang

Malaria merupakan penyakit infeksi parasit utama di dunia yang mengenai hampir 170 juta orang tiap tahunnya. Penyakit ini juga berjangkit di hampir 103 negara, terutama negara-negara di daerah tropik dan subtropik. Di Indonesia, malaria tergolong penyakit menular yang masih bermasalah. Penyakit ini berjangkit di semua pulau di Indonesia, mulai dari dataran rendah hingga dataran tinggi, baik di kota maupun di desa. Sebagian penduduk di 20 provinsi di Indonesia terjangkit malaria. Lebih dari 40 juta penduduk Indonesia bermukim di daerah malaria, sekitar 11 juta diantaranya tinggal di Jawa dan Bali. (Mursito, 2002;WHO,2003)

Pemberantasan terhadap penyakit malaria mengalami berbagai kendala, terutama dengan berkembangnya galur parasit yang resisten terhadap obat-obatan yang ada saat ini. Oleh karena itu pengobatan alternatif yang efektif khususnya dari bahan alam sangat dibutuhkan baik saat ini maupun dimasa-masa mendatang.

Penggunaan tumbuhan atau bagian tumbuhan untuk obat malaria sudah dikenal sejak ribuan tahun yang lalu. Dimulai dari ditemukannya obat malaria yang pertama yaitu kinina, suatu senyawa alkaloid yang berhasil diisolasi dari kulit batang kina (*Cinchona succirubra*) pada tahun 1820, sampai penemuan artemisinin, suatu senyawa seskuiterpen lakton yang berhasil diisolasi dari tanaman *Artemisia annua* (Klayman, 1985)

Andrographis paniculata Nees. atau yang biasa dikenal dengan nama daerah sambiloto merupakan tanaman obat yang secara empiris digunakan sebagai antimalaria. Masyarakat Indonesia di Flores (NTT) diketahui menggunakan rebusan herba sambiloto untuk mengobati penderita malaria secara tradisional. Tanaman ini mempunyai kandungan senyawa golongan diterpen lakton dengan kandungan utama senyawa andrografolida, yang memiliki berbagai aktivitas farmakologis termasuk antimalaria.(Matsuda, 1994)

Penelitian ilmiah membuktikan bahwa tanaman ini mempunyai aktivitas antimalaria. Rahman *et al*, 1999 melaporkan bahwa ekstrak sambiloto menunjukkan aktivitas antimalaria terhadap *Plasmodium berghei in vivo* pada mencit. Serangkaian penelitian telah kami lakukan untuk mengetahui aktivitas antimalaria dari tanaman sambiloto ini. Penelitian terdahulu kami menunjukkan bahwa ekstrak tanaman ini mempunyai aktivitas antimalaria dengan cara menghambat pertumbuhan *Plasmodium falciparum in vitro* (Suyantó, 1995; Widyawaruyanti, dkk, 1995). Tidak hanya ekstrak, dari hasil penelitian kami (Dina, 2001; Neni, 2001; Sri, 2001; Widyawaruyanti dkk, 2003) juga diketahui bahwa isolat andrografolida dapat menghambat 50% pertumbuhan *Plasmodium berghei* (ED_{50}) secara *in vivo* sebesar 3,6 mg/kg BB. Pada penelitian tersebut juga telah dapat dipisahkan isolat diterpen lakton lainnya yang juga mempunyai aktivitas antimalaria. Isolat diterpen lakton ini mampu menghambat pertumbuhan *Plasmodium falciparum* pada stadium gametosit *in vitro* (IC_{50} 4,19 $\mu\text{g/mL}$ pada inkubasi 72 jam). Aktivitas ini setara dengan aktivitas obat standar primakuin. Isolat diterpen lakton juga mempunyai aktivitas skizontosida dengan nilai IC_{50} 14,12 $\mu\text{g/mL}$.

Dalam upaya membuktikan aktivitas antimalaria dari sambiloto, penelitian terakhir kami menunjukkan bahwa kombinasi ekstrak etanol 80% sambiloto 100 mg/kg BB dan klorokuin 0,1567 mg/kg BB memberikan potensi keberhasilan terapi yang paling besar pada mencit terinfeksi *Plasmodium berghei* dibandingkan pemberian klorokuin maupun ekstrak sambiloto secara terpisah (Hafid, 2007).

Mengingat potensinya sebagai obat antimalaria, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengembangkan sambiloto ini sebagai produk obat malaria baru. Permasalahannya, selama ini pemanfaatan sambiloto secara tradisional oleh masyarakat dalam mengobati penyakit malaria selama ini, tidak dapat menjamin kejelasan khasiat, keamanan dan kualitasnya. Sehingga sulit dipertanggung jawabkan secara medis. Oleh karena itu perlu dikembangkan pemanfaatan tanaman ini sebagai produk fitofarmakanya yang menggunakan pendekatan multikomponen, bukan strategi penemuan zat tunggal seperti pada obat modern.

Dalam bentuk produk fitofarmaka, dapat terjamin keajegan komposisi zat kandungan. Karena itu perlu dilakukan standarisasi terhadap bahan baku obat dan produk akhirnya. Sehingga dapat terkontrol baik khasiatnya sebagai obat malaria, juga kualitas dan keamanannya. Dengan demikian dapat diterima oleh profesi kesehatan baik dokter maupun apoteker dan dapat masuk dalam sistem kesehatan formal untuk mengobati pasien malaria.

Berdasarkan latar belakang tersebut di atas, maka pada penelitian ini akan dikembangkan produk fitofarmaka dari fraksi diterpen lakton herba sambiloto. Selain diketahui aktif sebagai antimalaria baik *in vivo* maupun *in vitro*, fraksi diterpen lakton juga dapat diperoleh dari herba sambiloto dalam jumlah cukup besar. Sehingga sangat potensial sebagai bahan baku obat malaria.

Untuk tujuan manufaktur sediaan obat, maka fraksi diterpen lakton sebagai bahan baku obat harus dibuat dalam bentuk sediaan kering dispersi solida. Hal ini dilakukan untuk memberikan jaminan bahwa obat dalam ekstrak/fraksi terbagi secara molekuler dalam matriks terpilih serta akan dapat memperbaiki nilai parameter farmasetik dan bioavailabilitas. Dispersi solida adalah konsep fisika dimana zat padat terdispersi (terbagi homogen) sebagai partikel kecil atau masa molekuler dalam suatu matriks berupa polimer terpilih.

Selanjutnya untuk mencapai tujuan terapi, maka perlu dilakukan studi mengenai formulasi dan manufaktur sediaan obat (*dosage form*) yang memperhatikan konsep *drug delivery system* (DDS). Komponen senyawa obat dalam ekstrak/fraksi harus dijamin akan diantarkan menuju target terapi, yaitu dalam rancangan formulasi dan manufaktur dengan penambahan bahan pendukung untuk tercapainya bioavailabilitas yang optimal dan tercapainya tujuan terapi.

Untuk maksud tersebut di atas maka penelitian ini akan dilakukan dalam dua tahap :

1. Pada tahun pertama, akan dilakukan standarisasi proses pemisahan fraksi diterpen lakton dari ekstrak etanol sambiloto sebagai fraksi aktif antimalaria, pemilihan metode validasi penetapan kadar andrografolida (senyawa marker aktif) di dalam fraksi diterpen lakton sebagai salah satu parameter standarisasi fraksi. Pada tahun pertama ini, bekerja sama dengan divisi riset PT Kimia

Farma akan dilakukan pengembangan produk fitofarmaka fraksi diterpen lakton yang aktif sebagai antimalaria.

2. Pada tahun kedua bekerja sama dengan Lembaga Penyakit Tropis Unair, akan dilakukan uji preklinik untuk mengetahui khasiat dan keamanan produk fitofarmaka dari fraksi diterpen lakton sambiloto pada hewan coba dan uji klinik untuk mengetahui efektifitas dan keamanannya pada manusia.

1.2. Rumusan Masalah

1. Bagaimana standar proses produksi fraksi diterpen lakton sambiloto ?
2. Bagaimana validitas metode penetapan kadar senyawa marker andrografolida di dalam fraksi diterpen lakton sambiloto ?
3. Bagaimana formula produk fitofarmaka fraksi diterpen lakton sambiloto yang aktif, berkualitas dan aman sebagai obat antimalaria
4. Apakah produk fitofarmaka dari fraksi diterpen lakton sambiloto efektif, berkualitas dan aman sebagai obat malaria pada uji klinik ?

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan Umum : Mendapatkan produk fitofarmaka obat malaria dari fraksi diterpen lakton herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees)

Tujuan Khusus :

1. Standarisasi prosedur pemisahan fraksi diterpen lakton sebagai fraksi aktif antimalaria : Dilakukan di Fakultas Farmasi Unair
2. Validasi metode penetapan kadar andrografolida (senyawa marker aktif) dalam fraksi diterpen lakton sebagai salah satu parameter standarisasi : Dilakukan di Fakultas Farmasi Unair.
3. Uji aktivitas antimalaria dari fraksi diterpen lakton sambiloto pada mencit terinfeksi parasit *Plasmodium berghei*. Dilakukan di fakultas Farmasi Unair
4. Studi formulasi untuk mendapatkan rancangan dasar produk sistem dispersi padat fraksi diterpen lakton sebagai produk fitofarmaka yang efektif dan berkualitas : dilakukan di Fakultas Farmasi, bekerjasama dengan divisi risbang PT Kimia Farma.

5. Uji preklinik untuk mengetahui aktivitas dan keamanannya pada hewan coba dan uji klinik pada manusia. Uji preklinik dan uji klinik dilakukan bekerjasama dengan Lembaga Penyakit Tropis Indonesia.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Tentang tanaman Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees)

Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) termasuk kedalam famili Acanthaceae. Banyak tumbuh di India, semenanjung Malaysia dan hampir di seluruh Indonesia pada ketinggian 1-700 m di atas permukaan laut. Digunakan secara tradisional di Indonesia untuk mengobati penyakit malaria, tifus, difteri, diabetes, faringitis, tonsilitis, demam, gatal-gatal, digigit serangga atau ular berbisa, disentri, dan penambah nafsu makan (Heyne, 1987)

Andrografolida adalah senyawa diterpen lakton yang merupakan senyawa utama dari sambiloto dengan kadar sekitar 2,5%. Disamping itu sambiloto juga mengandung glikosida diterpen lakton seperti : neoandrografolida, deoksiandrografolida, 14-epiandrografolida, isoandrografolida, 14-deoksiandrografolida, 14-deoksi-12-metoksiandrografolida, 12-epi-14-deoksi-12-metoksiandrografolida, 14-deoksi-12-hidroksi-andrografolida, 14-deoksi-11-hidroksiandrografolida, 14-deoksi-11,12-dihidroksiandrografisida, andrografisida, 6-asetoandrografolida, bisandrografolida A,B,C dan D. Senyawa-senyawa ini umumnya terdapat pada bagian daun (*aerial parts*). Pada bagian akar umumnya terdapat senyawa golongan flavonoid yang terdiri atas : polimetoksilflavon, andrographin, paniculin, mono-o-metil wightin dan apigenin-7,4 dimetilester. (Matsuda, T.,1994)



Gambar 2.1. Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees)

2.2. Studi pendahuluan yang telah dilakukan

1. Widyawaruyanti, dkk, 1995-2000, melaporkan bahwa ekstrak petroleum eter, kloroform dan heksan dari sambiloto dapat menghambat pertumbuhan parasit *P.falciparum* secara *in vitro*.
2. Widyawaruyanti, dkk,2001, melaporkan bahwa senyawa andrografolida hasil isolasi sambiloto mempunyai aktivitas sebagai skizontosida ($IC_{50} = 12,16 \mu\text{g/ml}$) dan gametosida ($IC_{50} = 3,61 \mu\text{g/ml}$) *in vitro*
3. Suyanto, 1995, juga melaporkan bahwa isolat dari fraksi kloroform ekstrak metanol sambiloto yang diduga merupakan salah satu glikosida diterpen lakton dapat menghambat pertumbuhan *P.falciparum*.
4. Najib Rahman, 1999, meneliti aktifitas antimalaria dari ekstrak metanol dan kloroform sambiloto secara *in vitro* dan *in vivo*, hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kloroform lebih aktif menghambat pertumbuhan parasit dibandingkan ekstrak metanol baik secara *in vivo* maupun *in vitro*.
5. Wiwied Ekasari (1998) dan Muhammad Adlan (1997) dalam penelitiannya melaporkan bahwa kadar andrografolida yang terkandung dalam simplisia kering adalah $\pm 2,5 \%$, sedangkan dalam ekstrak etanol $\pm 10.69\%$.
6. Radjaram A. (2001), melakukan penelitian untuk mengembangkan sediaan farmasetika dari senyawa andrografolida dan hasil penelitiannya menunjukkan bahwa sistem dispersi padat andrografolida dengan pembawa HPMC3cp, HPCSL dan PEG 6000(1:4) dapat meningkatkan laju disolusi andrografolida dua kali lebih besar dibandingkan campuran fisik.
7. Widyawaruyanti, A. (2004), mengembangkan formulasi produk tablet dispersi padat dari senyawa andrografolida dan hasil penelitian menunjukkan, tablet andrografolida ini lebih aktif sebagai antimalaria dibandingkan isolate andrografolida

BAB III

BAHAN DAN METODE PENELITIAN

3.1. Bahan dan alat yang digunakan

Bahan tanaman sambiloto diperoleh dari Divisi Risbang PT. Kimia Farma, Tbk. Bahan simplisia sudah dalam bentuk serbuk berwarna hijau, rasanya pahit, dengan kadar andrografolida 1,89 %.

Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini berderajat pro analisis, kecuali etanol untuk ekstraksi.

Alat yang digunakan adalah maserator, rotavapor, mikroskop, KLT densitometer, alat disolusi, granulator dll

3.2. Standarisasi Proses Produksi Fraksi Diterpen Lakton Sambiloto

Serbuk sambiloto diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan etanol 80%. Ekstrak yang diperoleh kemudian diuapkan dalam rotavapor. Ekstrak pekat yang diperoleh lalu difraksinasi dengan pelarut etilasetat:air(1/1 v/v). Fraksi etilasetat kemudian dipisahkan dan diuapkan dalam rotavapor. Kristal yang terbentuk pada penguapan fraksi etilasetat ini kemudian dikumpulkan sebagai fraksi diterpen lakton. Setiap tahapan pada proses ini dicatat sebagai standar proses produksi fraksi diterpen lakton dari sambiloto.

3.3. Pengembangan Metode Validasi Penetapan Kadar Senyawa Aktif (Andrografolida) Di Dalam Fraksi Diterpen Lakton Dengan KLT-Densitometri

3.3.1. Pengembangan metode validasi

Pembuatan larutan baku

Dibuat larutan baku induk dengan cara menimbang 1 mg standar andrografolida, kemudian dilarutkan dalam 1 ml etanol p.a (kadar andrografolida 1000 ppm), divortex selama 5 menit dan dipanaskan dalam waterbath suhu 50°C selama 10 menit. Selanjutnya dibuat larutan baku kerja dengan kadar 300 ppm, 400 pm, 500 ppm, 600 pm, 700 ppm, 800 ppm dan 900 ppm.

Penentuan selektivitas/spesifisitas

Penentuan selektivitas/spesifisitas dilakukan untuk menentukan fase gerak terpilih yang memberikan nilai resolusi (R_s) yang baik pada panjang gelombang maksimum. Berdasarkan penelitian sebelumnya, diketahui fase gerak terpilih adalah kloroform-metanol (9:1 v/v), dan panjang gelombang maksimum 231 nm. Resolusi dihitung dengan menggunakan rumus :

$$R_s = \frac{2 \Delta Z}{W_A + W_B}$$

Dimana : ΔZ = jarak dua noda analit

W_A = lebar noda analit A

W_B = lebar noda analit B

Penentuan linearitas

Penentuan linearitas dilakukan dengan menotolkan larutan standar 300 ppm (0,3 μg), 400 pm (0,4 μg), 500 ppm (0,5 μg), 600 ppm (0,6 μg), 700 ppm (0,7 μg), 800 ppm (0,8 μg), 900 ppm (0,9 μg) dan 1000 ppm (1,0 μg), pada lempeng KLT masing-masing 1 μl . Kemudian diekspansi dengan eluen terpilih dan dipayar dengan Densitometer pada λ_{maks} terpilih. Kemudian dilakukan analisis regresi linier antara kadar dan luas area noda, dihitung parameter linieritas yaitu r dan sdv.

Penentuan LOD dan LOQ

Penentuan LOD dan LOQ dilakukan dengan menotolkan larutan standar 300 ppm (0,3 μg), 400 pm (0,4 μg), 500 ppm (0,5 μg), 600 ppm (0,6 μg), 700 ppm (0,7 μg), 800 ppm (0,8 μg), 900 ppm (0,9 μg) dan 1000 ppm (1,0 μg), pada plate KLT masing-masing 1 μl . Kemudian diekspansi dengan eluen terpilih dan dipayar dengan Densitometer pada λ_{maks} terpilih. Kemudian dilakukan analisis regresi linier antara kadar dan luas area noda, dihitung parameter linieritas yaitu r, X_p dan sdv. LOD dihitung sebagai X_p , LOQ dihitung sebagai 3 kali LOD.

Penentuan akurasi

- Ditimbang sampel fraksi diterpen lakton metode 5A1 sebanyak 1,0 mg dan standar andrografolida sebanyak 1,0 mg, dilarutkan dalam 1 ml etanol p.a. Kemudian divortex selama 5 menit dan dipanaskan dalam waterbath suhu 50°C selama 10 menit. Replikasi 6 kali. Kemudian, masing-masing ditotolkan pada lempeng KLT sebanyak 1 µl.
- Penentuan akurasi dilakukan dengan menentukan nilai % rekoverti menggunakan *standard addition method*. Pada studi ini, 100 µl fraksi diterpen lakton (2000 ppm) ditambah dengan 100 µl larutan standar andrografolida 1000 ppm, 1500 ppm dan 2000 ppm. Kemudian, masing-masing ditotolkan pada lempeng KLT sebanyak 1 µl.
- Pada lempeng KLT yang sama juga ditotolkan sebanyak 1 µl larutan standar 300 ppm (0,3 µg), 400 pm (0,4 µg), 500 ppm (0,5 µg), 600 ppm (0,6 µg), 700 ppm (0,7 µg), 800 ppm (0,8 µg), 900 ppm (0,9 µg) dan 1000 ppm (1,0 µg), kemudian diekspansi dengan eluen terpilih dan diukur areanya dengan densitometer pada panjang gelombang terpilih.
- Persen rekoverti dihitung dengan rumus berikut:

$$\% \text{Rekoverti} = \frac{C_t}{C_p + C_n} \times 100\%$$

dimana: C_t = kadar *marker* yang diperoleh dari hasil *spiking*

C_p = kadar *marker* dalam ekstrak

C_n = kadar *marker* yang ditambahkan

Penentuan presisi

Intraday: Ditimbang sampel fraksi diterpen lakton metode 5A1 sebanyak 1,0 mg dan standar andrografolida sebanyak 1,0 mg, dilarutkan dalam 1 ml etanol p.a. Kemudian divortex selama 5 menit dan dipanaskan dalam waterbath suhu 50°C selama 10 menit. Replikasi 6 kali. Kemudian, masing-masing ditotolkan pada lempeng KLT sebanyak 1 µl Pada lempeng KLT yang sama juga ditotolkan sebanyak 1 µL larutan standar 300 ppm (0,3 µg), 400 pm (0,4 µg), 500 ppm (0,5 µg), 600 ppm (0,6 µg), 700 ppm (0,7 µg), 800 ppm (0,8 µg), 900 ppm (0,9 µg) dan 1000 ppm (1,0 µg). Selanjutnya diekspansi dalam sistem pelarut pengembang terpilih dan

diukur areanya dengan densitometer pada panjang gelombang terpilih. Kadar andrografolida yang didapat digunakan untuk menghitung standar deviasi dan koefisien variasi.

3.3.2. Penetapan Kadar Andrografolida dalam Fraksi Diterpen Lakton yang Diperoleh dengan Berbagai Metode Pemisahan

Ditimbang sampel fraksi diterpen lakton yang diperoleh dari berbagai metode pemisahan sebanyak 1,0 mg dan standar andrografolida sebanyak 1,0 mg, dilarutkan dalam 1 ml etanol p.a. Kemudian divortex selama 5 menit dan dipanaskan dalam waterbath suhu 50°C selama 10 menit. Replikasi 3 kali. Kemudian, masing-masing ditotolkan pada lempeng KLT sebanyak 1 μ l. Pada lempeng KLT yang sama juga ditotolkan sebanyak 1 μ L larutan standar 300 ppm (0,3 μ g), 400 pm (0,4 μ g), 500 ppm (0,5 μ g), 600 ppm (0,6 μ g), 700 ppm (0,7 μ g), 800 ppm (0,8 μ g), 900 ppm (0,9 μ g) dan 1000 ppm (1,0 μ g), kemudian diekspansi dengan eluen terpilih dan diukur areanya dengan densitometer pada panjang gelombang terpilih. Kadar andrografolida yang didapat digunakan untuk menghitung standar deviasi dan koefisien variasi.

3.3.3 Penetapan Profil Kromatogram KLT Densitometri

Profil kromatogram menggambarkan ciri spesifik dari fraksi diterpen lakton. Dilakukan dengan menggunakan alat densitometer (KLT).

3.4. Pengembangan Formula Fraksi Diterpen Lakton Yang Aktif Sebagai Antimalaria

3.4.1. Studi praformulasi :

Dari hasil studi ini akan diperoleh data sifat fisika kimia fraksi diterpen lakton dan rancangan dasar sistem dispersi padat. Pada tahapan ini akan dilihat bagaimana interaksi fraksi diterpen lakton dengan bahan pembawa dalam peningkatan kelarutan marker aktif andrografolida.

1. Pembuatan Kurva Baku Fraksi Diterpen Lakton

a. Pembuatan Larutan Baku Induk Fraksi Diterpen Lakton

Ditimbang sejumlah 10.0 mg fraksi diterpen lakton, dimasukkan ke dalam labu 100 mL secara kuantitatif kemudian ditambahkan ke dalamnya etanol 96% sebanyak 10 mL, kemudian diultrasonik, ditambahkan aquadest sampai tepat tanda. Diperoleh larutan baku induk kadar 100 ppm.

b. Pembuatan Larutan Baku Kerja Fraksi Diterpen Lakton

Dari larutan baku induk 100 ppm dibuat larutan baku kerja dengan kadar 2.0; 4.0; 8.0; 12.0; 18.0; 20.0; 40.0 dan 60.0 ppm dengan memipet masing-masing sejumlah 0.5; 1.0; 2.0; 3.0; 4.0; 5.0; 10.0 dan 15.0 mL larutan baku induk kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL secara kuantitatif dan ditambahkan aquadest sampai tepat tanda.

c. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Fraksi Diterpen Lakton

Panjang gelombang maksimum fraksi diterpen lakton ditentukan dengan mengukur spektrum larutan baku kerja kadar 4.0; 8.0 dan 16.0 ppm pada panjang gelombang 200-400 nm.

Panjang gelombang maksimum merupakan panjang gelombang yang memberikan absorbansi terbesar.

d. Pembuatan Kurva Baku Fraksi Diterpen Lakton

Kurva baku dibuat dengan menggunakan larutan baku kerja fraksi diterpen lakton kadar 2.0; 4.0; 8.0; 12.0; 18.0; 20.0 ppm, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum. Data yang diperoleh dibuat kurva regresi linier antara absorban terhadap konsentrasi. Adanya korelasi linier antara absorban dan konsentrasi dapat diketahui dengan melakukan uji linieritas.

2. Penentuan Kelarutan Fraksi Diterpen Lakton dalam Air.

Ditimbang sejumlah 50 mg fraksi diterpen lakton kemudian ditambahkan ke dalamnya 15 mL aquadest. Larutan tersebut kemudian diultrasonik selama 1

jam kemudian diaduk di atas magnetic stirrer. Dilakukan pengambilan cuplikan sampel pada jam ke-1, 2, 3, 4 dan 5 dengan menyaring sampel disaring dengan membran filter 0,45 µm kemudian dipipet sejumlah 1 mL kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL secara kuantitatif, ditambahkan ke dalamnya aquadest sampai tepat tanda. Kemudian dilakukan penentuan jumlah fraksi diterpen lakton terlarut dengan metode spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum.

3. Penentuan Pengaruh Bahan Tambahan Terhadap Spektrum Fraksi Diterpen Lakton

Dilakukan pengukuran spektrum larutan fraksi diterpen lakton 12.0 ppm, larutan PVP K-30 12.0 ppm, PEG 8000 12.0 ppm serta larutan Myrj 52 1.2 ppm (berdasarkan komposisi formula optimasi dengan perbandingan terbesar) dengan cara :

- Ditimbang sejumlah 10.0 mg untuk masing-masing bahan, dimasukkan ke dalam labu 100 mL secara kuantitatif kemudian ditambahkan ke dalamnya etanol 96% sebanyak 10 mL, kemudian diultrasonik, ditambahkan aquadest sampai tepat tanda (100.0 ppm). Dipipet dari larutan ini sejumlah 3 mL kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL kemudian ditambahkan aquadest sampai tepat tanda (12.0 ppm).
- Untuk larutan uji Myrj 52, dipipet sejumlah 1.0 mL dari larutan 12.0 ppm kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10.0 mL kemudian ditambahkan aquadest sampai tepat tanda.

4. Pembuatan Dispersi Padat Fraksi Diterpen Lakton

Dilakukan optimasi formula dispersi padat fraksi diterpen lakton dengan formula sebagai berikut :

Tabel III.1. Formula Optimasi Dispersi Padat Fraksi Diterpen Lakton Ekstrak Sambiloto

No.	Bahan	Jumlah (mg)		
		FI	FII	FIII
1	Fraksi diterpen lakton	600	600	600
2	PEG 8000	600	-	300
3	PVP K-30	-	600	300
4.	Myrj 52	60	60	60

Produk dispersi padat fraksi diterpen lakton dibuat dengan cara :

Ditimbang dengan teliti masing-masing bahan. Kemudian dimasukkan ke dalam cawan porselen dan ditambahkan ke dalamnya etanol 96% hangat. Kemudian diaduk homogen dengan menggunakan magnetic stirrer sampai etanol menguap dan diperoleh massa kental. Kemudian massa tersebut dikeringkan di dalam oven suhu 40^oC sampai diperoleh dispersi padat yang kering. Kemudian disimpan dalam eksikator (48 jam), diserbuk dengan mortir agat dan diayak (mesh 35).

3.4.2. Pembuatan Massa Tablet Fraksi Diterpen Lakton

Dibuat formula tablet produk dispersi padat fraksi diterpen lakton dengan penambahan eksipien Avicel PH102 dan Mg-Stearat menggunakan metode cetak langsung. Serbuk dispersi padat fraksi diterpen lakton dicampur dengan eksipien tersebut lalu dicetak dengan tekanan 1 ton selama 2 detik.

Tabel III.2. Komposisi Formula Tablet Cetak langsung Fraksi Diterpen Lakton

Bahan	Komposisi (%)	Jumlah (mg)
Serbuk Fraksi Diterpen Lakton	77.0	115.5
Avicel PH102	22.0	33.0
Mg Stearat	1.0	1.5

3.4.3. Penetapan Kadar Fraksi Diterpen Lakton Dalam Tablet

Diambil 3 tablet, kemudian digerus homogen. Kemudian ditimbang sejumlah 50.0 mg massa tablet, dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian ditambahkan ke dalamnya 10 mL etanol 96% kemudian diultrasonik. Kemudian ditambahkan ke dalamnya aquadest sampai tepat tanda. Dari larutan ini disaring kemudian dipipet sejumlah 3 mL filtrat, dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL kemudian ditambahkan aquadest sampai tepat tanda. Dilakukan penetapan kadar dengan metode spektrofotometri UV-Vis.

3.4.4. Uji Kekerasan dan Uji Disintegrasi Tablet Fraksi Diterpen Lakton

Dilakukan uji karakteristik fisik tablet meliputi uji kekerasan dan uji waktu hancur tablet sebagai berikut :

a. Uji Kekerasan

Alat : Erweka Hardness Tester

Metode : diambil satu tablet, letakkan pada papan uji. Diatur parameter uji kekerasan yang tertera pada alat meliputi diameter tablet serta jumlah tablet yang diukur. Setelah siap, tekan tombol start, kemudian lihat angka yang tertera pada monitor alat. Uji dilakukan dengan 3 kali replikasi

b. Uji Waktu Disintegrasi

Alat : Erweka Disintegration Apparatus

Metode : dimasukkan 1 tablet pada masing-masing tabung pada keranjang, masukkan 1 cakram pada tiap tabung dan jalankan alat. Digunakan air bersuhu 37 ± 0.1 °C sebagai media. Pada akhir batas waktu, angkat keranjang dan amati semua tablet. Semua tablet harus hancur sempurna.

3.4.5. Penentuan Laju Disolusi Tablet Fraksi Diterpen Lakton

Dilakukan uji disolusi tablet fraksi diterpen lakton dengan cara dimasukkan 1 tablet uji pada labu disolusi yang berisi 900 mL aquadest. Uji disolusi dilakukan dengan menggunakan pengaduk tipe dayung dengan kecepatan 100 rpm pada suhu 37 ± 0.1 °C. Cuplikan diambil sebanyak 5 mL pada setiap interval waktu (menit ke-0, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 30, 40, 50, dan 60) kemudian disaring dengan membrane filter 0.45 μ m. setiap pengambilan cuplikan, media disolusi diganti dengan media aquadest sebanyak volume yang diambil. Kemudian masing-masing cuplikan diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Kemudian dihitung kadar fraksi diterpen lakton pada setiap sampel dengan koreksi Wurster dan dihitung efisiensi disolusi.

Analisa data dilakukan dengan menggunakan Anava satu arah dan bila terdapat perbedaan dilanjutkan dengan uji HSD.

Formula tablet dispersi padat fraksi diterpen lakton yang memberikan laju disolusi terbaik kemudian dicetak menjadi tablet dan diuji aktivitas antimalarianya.

3.5. Uji Aktivitas Antimalaria Dan Penentuan Dosis Efektif Fraksi Diterpen Lakton Sambiloto Pada Mencit Terinfeksi Parasit Malaria.

Uji dilakukan terhadap mencit jantan yang diinfeksi *Plasmodium berghei*. Akan diamati penurunan tingkat parasitemia pada mencit setelah diobati dengan fraksi diterpen lakton peroral. Mencit yang telah terinfeksi parasit dibagi sesuai dengan bahan uji masing-masing terdiri atas 5 ekor. Kelompok perlakuan (4 kelompok) diberi suspensi bahan uji dalam CMC-Na (0,5%) dengan berbagai dosis secara per oral dalam dosis tunggal dan juga dosis terbagi (dua kali sehari). Untuk pemberian dosis tunggal (3

kelompok), bahan uji diberikan dengan dosis 100, 10, 1 mg/kg BB mencit untuk masing-masing kelompok, sedangkan untuk dosis terbagi (1 kelompok) diberikan dua kali sehari dengan dosis 10 mg. Kelompok kontrol positif diberi suspensi bahan uji dalam CMC-Na (0,5 %) sedangkan kelompok kontrol negatif hanya diberi suspensi CMC-Na (1%). Setiap hari terhadap kelompok-kelompok tersebut dilakukan pengambilan darah dari bagian ekor dan dibuat hapusan darah tipis dengan pewarnaan Giemsa. Kemudian dihitung % parasitemianya. Data dianalisis menggunakan Probit analisis dengan membandingkan tingkat pertumbuhan parasit pada kontrol negatif.

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Standarisasi Proses Ekstraksi Sambiloto untuk mendapatkan Fraksi Diterpen Lakton (DL)

Metode 1

Dilakukan maserasi dengan stirer terhadap 250 mg serbuk simplisia sambiloto dengan menggunakan alkohol 80 % sebanyak 5 liter, setiap 2 jam simplisia direndam dengan menggunakan 1,25 L alkohol 80 % . Ekstrak yang diperoleh kemudian ditampung dan dipekatkan hingga 20 % (1 Liter), kemudian dilakukan proses fraksinasi cair-cair dengan menggunakan perbandingan : Ekstrak : Air : Etil asetat (1:1:1 v/v)

Fraksinasi dilakukan sebanyak 3 kali, fraksi etil asetat yang diperoleh ditampung kemudian tambahkan natrium eksikatus , diamkan semalam. Keesokan harinya fraksi etil asetat dipekatkan hingga kental dan dilakukan proses penyaringan sehingga didapatkan kristal. Kristal yang didapat dicuci dengan etil asetat, kemudian keringkan dan timbang dari metode ini didapatkan fraksi diterpen lakton sebanyak 1,4 gr. Etil asetat yang berada pada wadah tampungan dipekatkan lagi dan dilakukan proses penyaringan fraksi diterpen lakton sehingga diperoleh diterpen lakton 1,1 gr.

Metode 2

Dilakukan maserasi dengan stirer terhadap 250 mg serbuk simplisia sambiloto dengan menggunakan N- Heksan sebanyak 5 liter, setiap 2 jam simplisia direndam dengan menggunakan 1,25 L N-heksan. Simplisia hasil maserasi dikeringkan dengan cara diangin-anginkan selama semalam, keesokan harinya simplisia tersebut dimasukkan oven pada suhu 40°C selama 1 jam hingga bau N-heksan tidak tercium lagi. Simplisia dimaserasi lagi dengan stirer dengan menggunakan etil asetat sebanyak 5 liter, setiap 2 jam simplisia direndam dengan menggunakan 1,25 L etil asetat. Ekstrak yang diperoleh kemudian ditampung dan dipekatkan hingga kental dan disaring, dari hasil penyaringan tidak didapatkan fraksi diterpen lakton.

Metode 3

Dilakukan maserasi dengan stirer terhadap 250 mg serbuk simplisia sambiloto dengan menggunakan alkohol 80 % sebanyak 5 liter sambil dilakukan proses pemanasan dengan menggunakan waterbath pada suhu 60° C, setiap 2 jam simplisia direndam dengan menggunakan 1,25 L alkohol 80 %. Ekstrak yang diperoleh kemudian ditampung sebanyak 75 % ekstrak dari total ekstrak yang diperoleh dipekatkan hingga 20 % (1 Liter), kemudian dilakukan proses fraksinasi cair-cair dengan menggunakan perbandingan : Ekstrak : Air : Etil asetat (1:1:1 v/v)

Fraksinasi dilakukan sebanyak 3 kali, fraksi etil asetat yang diperoleh ditampung kemudian tambahkan natrium eksikatus, diamkan semalam. Keesokan harinya fraksi etil asetat dipekatkan hingga kental dan dilakukan proses penyaringan sehingga didapatkan kristal. Kristal yang didapat dicuci dengan etil asetat, kemudian keringkan dan timbang dari metode ini didapatkan fraksi diterpen lakton sebanyak 0,8 gr. Etil asetat yang berada pada wadah tampungan dipekatkan lagi dan dilakukan proses penyaringan fraksi diterpen lakton sehingga diperoleh diterpen lakton 0,2 gr.

Metode 4

Dilakukan maserasi dengan stirer terhadap 250 mg serbuk simplisia sambiloto dengan menggunakan alkohol 96 % sebanyak 5 liter sambil dilakukan proses pemanasan dengan menggunakan waterbath pada suhu 60° C, setiap 2 jam simplisia direndam dengan menggunakan 1,25 L alkohol 96 %. Ekstrak yang diperoleh kemudian ditampung, kemudian tambahkan air sebanyak 20% , sebanyak 75 % ekstrak dari total ekstrak yang diperoleh dipekatkan hingga 20 % (1 Liter), kemudian dilakukan proses fraksinasi cair-cair dengan menggunakan perbandingan : Ekstrak : Air : Etil asetat (1:1:1,5 v/v).

Fraksinasi dilakukan sebanyak 3 kali, fraksi etil asetat yang diperoleh ditampung kemudian tambahkan natrium eksikatus, diamkan semalam. Keesokan harinya fraksi etil asetat dipekatkan hingga kental dan dilakukan proses penyaringan sehingga didapatkan kristal. Kristal yang didapat dicuci dengan etil

asetat, kemudian keringkan dan timbang dari metode ini didapatkan fraksi diterpen lakton sebanyak 0,3 gr.

Metode 5

Dilakukan maserasi dengan stirer terhadap 500 mg serbuk simplisia sambiloto dengan menggunakan alkohol 96 % sebanyak 5 liter, proses dilakukan selama 3 x 24 jam dengan pengadukan selama 15 menit tiap 3 jam sekali. Pada hari pertama simplisia direndam dengan 2 L alkohol 96 %, sedangkan untuk hari berikutnya simplisia direndam dengan 1,5 L alkohol 96% . Ekstrak yang diperoleh kemudian ditampung dan dipekatkan hingga 20% (1 Liter), kemudian tambahkan air sebanyak 20% ,kemudian dilakukan proses fraksinasi cair-cair dengan menggunakan perbandingan : Ekstrak : Air : Etil asetat (1:1:1,5 v/v)

Fraksinasi dilakukan sebanyak 5 kali, hingga fraksi etil asetat yang diperoleh berwarna bening, fraksi etil asetat ditampung kemudian langsung dipekatkan sehingga agak kental, diamkan semalam. Keesokan harinya fraksi etil asetat disaring sehingga didapatkan kristal. Kristal yang didapat dicuci dengan etil asetat, kemudian keringkan dan timbang dari metode ini didapatkan fraksi diterpen lakton sebanyak 3,3 gr.

Metode 6

Dilakukan maserasi dengan stirer terhadap 500 mg serbuk simplisia sambiloto dengan menggunakan alkohol 80 % sebanyak 5 liter, proses dilakukan selama 3 x 24 jam dengan pengadukan selama 15 menit tiap 3 jam sekali. Pada hari pertama simplisia direndam dengan 2 L alkohol 80 %, sedangkan untuk hari berikutnya simplisia direndam dengan 1,5 L alkohol 80% . Ekstrak yang diperoleh kemudian ditampung dan dipekatkan hingga 20% (1 Liter) ,kemudian dilakukan proses fraksinasi cair-cair dengan menggunakan perbandingan : Ekstrak : Air : Etil asetat (1:1:1 v/v)

Fraksinasi dilakukan sebanyak 5 kali, hingga fraksi etil asetat yang diperoleh berwarna bening, fraksi etil asetat ditampung kemudian langsung dipekatkan sehingga agak kental, diamkan semalam. Keesokan harinya fraksi etil asetat disaring sehingga didapatkan kristal. Namun pada metode ini tidak didapatkan kristal.

Tabel IV.1. Perbandingan antar metode ekstraksi :

Metode	1	2	3	4	5	6
Pelarut	Alkohol 80 %, 1,25 L tiap 2 jam	n-heksan, etil asetat	Alkohol 80 % dengan pemanasan	Alkohol 96 % dengan pemanasan	Alkohol 96 % perendaman selama 3x 24 jam, dan proses pengadukan tiap 3 jam selama 15 menit	Alkohol 80 % perendaman selama 3x 24 jam, dan proses pengadukan tiap 3 jam selama 15 menit
Fraksinasi	Ekstrak : air : etil asetat 1:1:1	-	Ekstrak : air : etil asetat 1:1:1	Ekstrak : air : etil asetat 1:1:1,5 dengan penambahan air 20 %	Ekstrak : air : etil asetat 1:1:1,5 dengan penambahan air 20 %	Ekstrak : air : etil asetat 1:1:1
Jumlah simplisia	250 g	250 g	250 g	250 g	500 g	500 g
Hasil	1,4 g 1,1 g	-	0,8 g 0,2 g	0,3 g	3,3 g	2,2 g

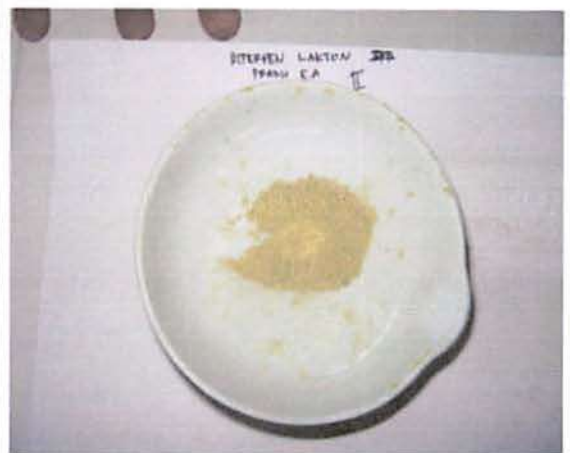
4.2. Proses produksi fraksi diterpen lakton menggunakan metode 5

Ditimbang sebanyak 1,5 kg sambiloto yang telah diserbuk, kemudian dilakukan proses perendaman dengan pelarut alkohol 96 % sebanyak 18 L selama 3x24 jam, menggunakan Rotavapor besar, untuk suhu water bath diatur pada suhu 30°C . Ekstrak sambiloto yang diperoleh kemudian dipekatkan hingga 20%, kemudian ditambahkan aquades sebanyak 20% dari hasil pemekatan. Selanjutnya dilakukan fraksinasi cair-cair dengan menggunakan etil asetat. Perbandingan yang digunakan : Ekstrak : Air : Etil asetat (1:1,5:1 v/v)

Fraksinasi dilakukan sebanyak 4 kali, hingga fraksi etil asetat yang diperoleh berwarna bening, fraksi etil asetat ditampung kemudian langsung dipekatkan sehingga agak kental, diamkan selama semalam. Keesokan harinya fraksi etil asetat disaring untuk mendapatkan kristal. Kristal yang didapat dicuci dengan etil asetat, kemudian keringkan dan timbang dari metode ini didapatkan fraksi diterpen lakton sebanyak 7,63 gr berbentuk serbuk amorf.



Gambar 4.1. Hasil akhir fraksinasi



Gambar 4.2. Hasil akhir fraksinasi



Gambar 4.3. Proses ekstraksi



Gambar 4.4. Hasil akhir fraksinasi

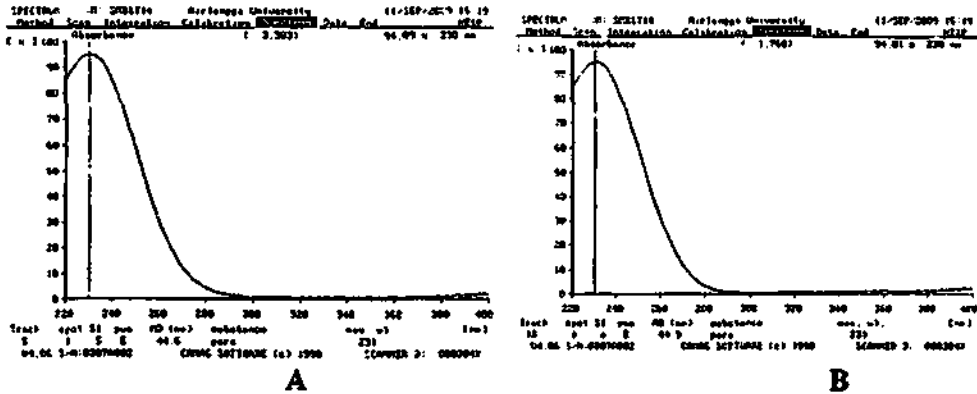


Gambar 4.5. Proses pengadukan menggunakan stirer.

4.3. Pengembangan Metode Validasi Analisis Kadar Andrografolida Dalam Fraksi Diterpen Lakton Sambiloto (*Andrographis Paniculata* Nees) Menggunakan Densitometer

Penentuan Selektivitas/Spesifisitas

Berdasarkan studi selektivitas/spesifisitas, analisis kadar andrografolida dalam fraksi diterpen lakton sambiloto dapat dilakukan dengan lempeng KLT Silika F254 menggunakan fase gerak terpilih kloroform-metanol (9:1 v/v), dan panjang gelombang maksimum 231 nm, dengan nilai resolusi sebesar 2,0 pada kromatogram standar andrografolida dan 2,38 pada kromatogram fraksi diterpen lakton sambiloto.



Gambar 4.6. Profil spektrum puncak standar andrografolida pada Rf 0,48 (A) dan spektrum puncak andrografolida yang terdeteksi pada fraksi diterpen laktone sambiloto pada Rf 0,48 (B) menggunakan Densitometer pada lempeng KLT Silika F254, eluasi dengan kloroform-metanol (9:1 v/v) dan panjang gelombang maksimum 231 nm

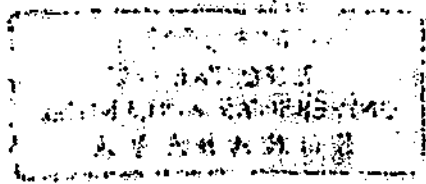
Penentuan Linearitas

Pada studi linearitas, diperoleh data seperti tercantum dalam tabel dibawah ini.

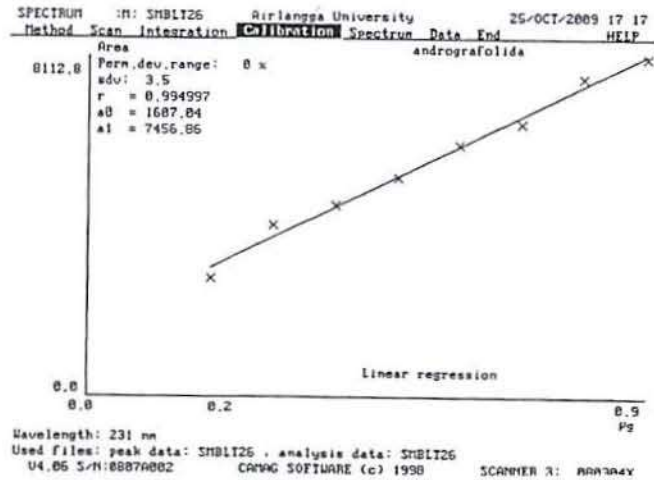
Tabel IV.2 Luas area puncak yang diperoleh pada penotolan berbagai jumlah standar andrografolida pada studi linearitas menggunakan Densitometer

No	Jumlah standar yang ditotolkan (µg)	Luas area puncak (AU)
1	0,3	2815,0
2	0,4	4103,7
3	0,5	4563,6
4	0,6	5229,4
5	0,7	6027,6
6	0,8	6539,7
7	0,9	7618,5
8	1,0	8112,8

Berdasarkan hasil studi linearitas, diperoleh persamaan regresi linier: $Y=7307,75X+876,25$, dengan nilai koefisien korelasi (r) sebesar



0,9949, sdv sebesar 3,5%. Hasil ini menunjukkan bahwa analisis kadar andrografolida dalam fraksi diterpen lakton sambiloto yang dilakukan dengan lempeng KLT Silika F254 menggunakan fase gerak terpilih kloroform-metanol (9:1 v/v) dan panjang gelombang maksimum 231 nm pada kisaran konsentrasi 300 ppm-1000 ppm (0,3 µg-1,0 µg) memberikan hasil pengukuran yang proporsional (linier).



Gambar 4.7. Kurva regresi linier antara jumlah standar andrografolida yang ditotolkan (µg) terhadap luas area puncak pada studi linearitas menggunakan Densitometer pada lempeng KLT Silika F254, eluasi dengan kloroform-metanol (9:1 v/v) dan panjang gelombang maksimum 231 nm

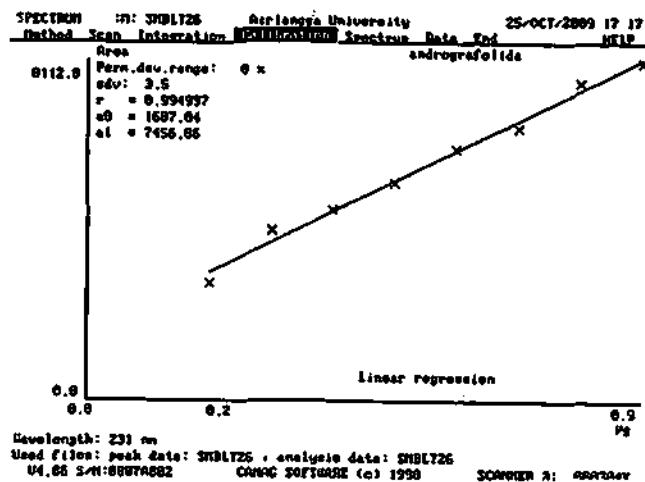
Penentuan LOD dan LOQ

Pada studi penentuan LOD dan LOQ, diperoleh data seperti tercantum dalam tabel dibawah ini.



Tabel IV.3 Luas area puncak yang diperoleh pada penotolan berbagai jumlah standar andrografolida pada studi penentuan LOD dan LOQ menggunakan Densitometer

No	Jumlah standar yang ditotolkan (μg)	Luas area puncak (AU)
1	0,3	2815,0
2	0,4	4103,7
3	0,5	4563,6
4	0,6	5229,4
5	0,7	6027,6
6	0,8	6539,7
7	0,9	7618,5
8	1,0	8112,8



Gambar 4.8. Kurva regresi linier antara jumlah standar andrografolida yang ditotolkan (μg) terhadap luas area puncak pada studi penentuan LOD dan LOQ menggunakan Densitometer pada lempeng KLT Silika F254, elusi dengan kloroform-metanol (9:1 v/v) dan panjang gelombang maksimum 231 nm

Berdasarkan hasil studi penentuan LOD dan LOQ, diperoleh persamaan regresi linier: $Y=7307,75X+876,25$, dengan nilai koefisien korelasi (r) sebesar 0,9949, $s.d.v$ sebesar 3,5% dan $Vx0$ sebesar 4,09%. Hasil ini menunjukkan bahwa analisis kadar andrografolida dalam fraksi diterpen lakton sambiloto yang dilakukan dengan lempeng KLT Silika F254 menggunakan fase gerak terpilih kloroform-metanol (9:1 v/v), dan panjang gelombang maksimum 231 nm pada kisaran konsentrasi 300 ppm-1000 ppm (0,3 μg -1,0 μg) memberikan hasil pengukuran yang

proporsional (linier). LOD dihitung sebagai $X_p = 0,18 \mu\text{g}$. $LOQ = 3 \times LOD = 0,54 \mu\text{g}$.

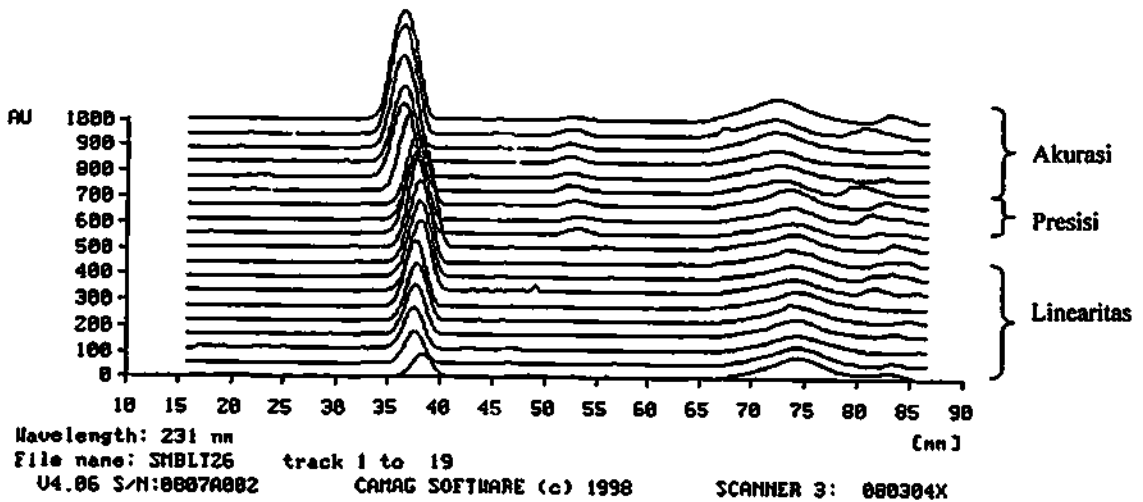
Penentuan Akurasi

Parameter akurasi ditentukan dengan menghitung persen rekoverti menggunakan *standard addition method*.

Tabel IV.4 Luas area puncak yang diperoleh pada penotolan berbagai jumlah standar andrografolida, fraksi diterpen lakton dan fraksi diterpen lakton yang ditambah standar pada studi penentuan akurasi menggunakan Densitometer

No	Kadar andrografolida dalam fraksi (μg)	Kadar andrografolida standar (μg)	Kadar andrografolida pada sampel addisi	% rekoverti (Mean)
1	0,75	0,5	1,09	87,20
	0,78	0,5	1,12	87,50
				87,35
2	0,72	0,75	1,43	97,28
	0,80	0,75	1,37	88,39
				92,84
3	0,76	1,0	1,44	81,81
	0,80	1,0	1,50	83,33
				82,57

Data pada tabel di atas menunjukkan bahwa pada studi akurasi, persen perolehan kembali (% rekoverti) berkisar antara 82,57 sampai 92,84%.



Gambar 4.9. Profil kromatogram standar andrografolida dan fraksi diterpen lakton sambiloto pada studi penentuan linearitas, akurasi dan presisi menggunakan Densitometer pada lempeng KLT Silika F254, eluasi dengan kloroform-metanol (9:1 v/v) dan panjang gelombang maksimum 231 nm

Penentuan Presisi

Penentuan presisi metode *intraday* dilakukan dengan menotolkan sejumlah tertentu fraksi diterpen lakton pada lempeng KLT dengan 6 kali replikasi, kemudian dianalisis dengan densitometer sehingga diperoleh luas area puncak. Luas area yang diperoleh dimasukkan dalam kurva kalibrasi sehingga diperoleh kadar andrografolida dalam fraksi diterpen lakton sambiloto. Studi presisi ini bertujuan untuk mengetahui *repeatability* metode analisis yang digunakan.

Tabel IV.5 Luas area puncak yang diperoleh pada penotolan fraksi diterpen lakton dengan 6 kali replikasi pada studi penentuan presisi menggunakan Densitometer

No	Fraksi diterpen lakton yang ditotolkan (μg)	Luas area puncak (AU)	Kadar andrografolida dalam fraksi diterpen lakton sambiloto (μg)	Kadar andrografolida dalam fraksi diterpen lakton sambiloto (%)
1	1	7223,4	0,75	75
2	1	7123,3	0,78	78

3	1	6939,4	0,72	72	
4	1	7582,8	0,80	80	
5	1	7274,4	0,76	76	
6	1	7562,7	0,80	80	
				Mean	76,83
				SD	3,13
				RSD	4,06

Berdasarkan data pada tabel di atas, pada studi presisi metode *intraday*, diperoleh Rerata kadar andrografolida dalam fraksi diterpen lakton sambiloto sebesar 76,83 %, dengan SD sebesar 3,13 dan RSD sebesar 4,06%.

Penetapan Kadar Andrografolida dalam Fraksi Diterpen Lakton yang Diperoleh dengan Berbagai Metode Pemisahan

Tabel IV.6 Luas area puncak yang diperoleh pada penotolan fraksi diterpen lakton dengan 3 kali replikasi pada studi penentuan kadar andrografolida dalam fraksi diterpen lakton sambiloto menggunakan KLT-Densitometer

No	Cara Pemisahan	Fraksi diterpen lakton yang ditotolkan (μg)	Luas area puncak (AU)	Kadar andrografolida dalam fraksi diterpen lakton sambiloto (μg)	Kadar andrografolida dalam fraksi diterpen lakton sambiloto (%) Mean \pm RSD
1	Metode 1A	1	5835,1	0,51	51
		1	5654,0	0,49	49
		1	5702,4	0,49	49
					49,67 \pm 2,32%
2	Metode 1B	1	3765,8	0,23	23
		1	4398,8	0,31	31
		1	4415,5	0,31	31
					28,33 \pm 16,31%
3	Metode 3A	1	5187,2	0,60	60
		1	5525,7	0,67	67
		1	5472,4	0,66	66
					64,33 \pm 5,89%
4	Metode 3B	1 1 1	Tidak terdeteksi		
5	Metode 4	1	6542,5	0,80	80
		1	6852,1	0,85	85

		1	7874,5	1,09	109 91,33±16,97%
6	Metode 5A1	1	7123,3	0,78	78
		1	7256,7	0,80	80
		1	7324,5	0,81	81
					79,67±1,92%
7	Metode 5A2	1	7379,6	0,78	78
		1	7683,7	0,82	82
		1	7089,7	0,74	74
					78,00±5,13%
8	Metode 5B	1	8811,0	0,96	96
		1	9016,7	0,99	99
		1	8962,4	0,98	98
					97,67±1,56%
9	Metode 5C	1	9289,2	1,00	100
		1	8280,5	0,89	89
		1	9052,6	0,99	99
					96,00±6,34%
10	Metode 6	1	7125,3	0,79	79
		1	7397,4	0,82	82
		1	7058,3	0,78	78
					79,67±2,61%
11	Metode 7A	1	8680,0	1,00	100
		1	7176,6	0,79	79
		1	8516,9	0,98	98
					92,33±12,55%
12	Metode 7B	1	6940,1	0,92	92
		1	6951,9	0,92	92
		1	6949,8	0,92	92
					92
13	Metode SB	1	7792,5	0,88	88
		1	7679,1	0,86	86
		1	6993,6	0,77	77
					83,67±7,00%

Berdasarkan data pada tabel di atas, kadar andrografolida dalam fraksi diterpen lakton sambiloto yang paling tinggi yaitu sebesar 97,67±1,56% diperoleh dengan metode pemisahan 5B. Sedangkan, kadar andrografolida dalam fraksi diterpen lakton sambiloto yang paling rendah (28,33±16,31%) diperoleh dengan metode pemisahan 1B. Pada fraksi

diterpen lakton yang diperoleh dengan metode pemisahan 3B, tidak terdeteksi adanya andrografolida.

4.4 Hasil Uji Khasiat Antimalaria Fraksi Diterpen Lakton (DTL) Sambiloto

Hapusan darah yang dibuat dengan pewarnaan Giemsa diamati dengan mikroskop pada perbesaran 1000 kali. Hasil pengamatan aktivitas antimalaria pemberian dosis tunggal dan dosis ganda dapat dilihat pada tabel dibawah

Tabel IV.7 Persen Parasitemia, Persen Pertumbuhan, Persen Penghambatan, dan Persen Penghambatan Rata-rata Fraksi DTL Sambiloto Pemberian Dosis Tunggal

Larutan Uji	Tanda	D0	D4	Persen Pertumbuhan	Persen Penghambatan	Persen Penghambatan Rata-Rata
dosis 100 mg/kgBB	1	0.60	6.35	5.75	60,67	66.41
	2	0.80	4.19	3.39	76,81	
	3	0.10	5.69	5.59	61,76	
dosis 10 mg/kgBB	1	0.45	6.29	5.79	60,39	56.45
	2	0.90	7.83	6.93	52,60	
	3	0.29	6.67	6.38	56,36	
dosis 1 mg/kgBB	1	0.19	10.44	10.25	29,89	29.32
	2	0.75	11.71	10.96	25,03	
	3	0.34	10.13	9.79	33,04	
kontrol (-)	1	1.10	11.75	11.65		14.62
	2	0.10	20.5	20.40		
	3	0.75	12.56	11.81		

Tabel IV.8 Persen Parasitemia, Persen Pertumbuhan, Persen Penghambatan, dan Persen Penghambatan Rata-rata Fraksi DTL Sambiloto Pemberian Dosis Ganda

Larutan Uji	Tanda	D0	D4	Persen Pertumbuhan	Persen Penghambatan	Persen Penghambatan Rata-Rata
dosis 10 mg/kgBB	1	0.30	1.36	1.06	90.59	66.41
	2	0.40	1.25	0.85	92.55	
	3	0.70	1.44	0.74	93.51	
kontrol (-)	1	0.81	12.11	11.30		
	2	0.50	11.34	10.84		
	3	0.79	12.44	11.65		

Analisa Data

Data persen penghambatan dan dosis dari uji aktivitas antimalaria terhadap mencit dianalisis dengan menggunakan analisa probit sehingga diperoleh harga ED_{50} dari Fraksi DTL Sambiloto pemberian dosis tunggal sebesar 9,17 mg/kgBB.

Analisis Data Uji Aktivitas *invivo* Fraksi DTL Sambiloto

Berdasarkan hasil pengujian aktivitas antimalaria berbagai dosis terapi fraksi DTL Sambiloto, dapat dilihat bahwa dosis terapi 100 mg/kg BB memiliki aktivitas yang paling besar apabila dibandingkan dengan kelompok dosis yang lain. Hal ini dapat diketahui dari nilai persen penghambatan yang paling besar yaitu 66.41% (pengamatan pada D_4).

Dari hasil analisis statistik Anova satu arah (*One Way Anova*) terhadap persen penghambatan pada pengamatan di hari ke-5 (D_4) dengan menggunakan program SPSS 15, diperoleh data seperti tampak pada tabel 8.

Tabel IV.9 Analisis Varians

	Jumlah kuadrat	dF	Rata-rata kuadrat	F	Signifikansi
Antar kelompok	2211,220	2	1105,610	29,398	,000
Dalam kelompok	225,652	6	37,609		
Total	2436,872	8			

Dari tabel 8 diperoleh hasil yaitu F hitung (29,398) lebih besar daripada F tabel (5,1) dan harga signifikan (0,000) lebih kecil dari α (0,05). Hal ini berarti ada perbedaan bermakna antara kelompok uji terhadap persen penghambatan parasit dengan tingkat kepercayaan 0,95 ($\alpha = 0,05$).

Analisis dilanjutkan dengan menggunakan uji pasca Anova (*Post Hoc Test*) yaitu Tukey's HSD untuk mengetahui kelompok uji yang memberikan perbedaan paling bermakna dan diperoleh data seperti tampak pada tabel IV.10

Tabel IV.10 Data HSD dari % Penghambatan terhadap Pertumbuhan Parasit Malaria antar Kelompok

Rata-rata Penghambatan tiap Kelompok	1 (66,41)	2 (56,45)	3 (29,32)
1 (66,41)	-	9,96	37,09*
2 (56,45)	9,96	-	27,13*
3 (29,32)	37,09*	27,13*	-

Tanda (*) menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna pada rentang kepercayaan pada $\alpha = 0,05$

Keterangan :

- 1 : Dosis 100 mg/kgBB
- 2 : Dosis 10 mg/kgBB
- 3 : Dosis 1 mg/kgBB

Hasil uji Tukey's HSD menunjukkan ada perbedaan bermakna antara kelompok uji 3 bila dibandingkan dengan kelompok uji 1 dan kelompok uji 2. Dari kelompok uji tersebut, kelompok uji 1 memberikan perbedaan yang paling bermakna terhadap daya hambat pertumbuhan parasit malaria pada tingkat kepercayaan 0,95 ($\alpha = 0,05$) bila dibandingkan dengan kelompok uji yang lain. Sedangkan antara kelompok uji 1 tidak memberikan perbedaan bermakna terhadap daya hambat pertumbuhan parasit malaria pada tingkat kepercayaan 0,95 ($\alpha = 0,05$) bila dibandingkan dengan kelompok uji 2.

Analisis Data Fraksi DTL Sambiloto Pemberian Dosis Ganda dan Dosis Tunggal

Berdasarkan hasil pengujian aktivitas antimalaria berbagai model terapi fraksi DTL Sambiloto, dapat dilihat bahwa model terapi dosis ganda memiliki aktivitas yang lebih besar apabila dibandingkan dengan dosis tunggal. Hal ini dapat diketahui dari nilai persen penghambatan pada dosis ganda yaitu 92.16% (pengamatan pada D_4) dan persen penghambatan pada dosis ganda sebesar 66.41% (pengamatan pada D_4).

Dari hasil analisis statistik Anova satu arah (*One Way Anova*) terhadap persen penghambatan pada pengamatan di hari ke-5 (D_4) dengan menggunakan program SPSS 15, diperoleh data seperti tampak pada tabel 10

Tabel IV.11 Analisis Varians

	Jumlah kuadrat	dF	Rata-rata kuadrat	F	Signifikansi
Antar kelompok	13566,301	2	6783,151	243,864	,000
Dalam kelompok	166,892	6	27,815		
Total	13733,193	8			

Dari tabel 10 diperoleh hasil yaitu F hitung (243,864) lebih besar daripada F tabel (5,1) dan harga signifikan (0,000) lebih kecil dari α (0,05). Hal ini berarti ada perbedaan bermakna antara kelompok uji terhadap persen penghambatan parasit dengan tingkat kepercayaan 0,95 ($\alpha = 0,05$).

Analisis dilanjutkan dengan menggunakan uji pasca Anova (*Post Hoc Test*) yaitu Tukey's HSD untuk mengetahui kelompok uji yang memberikan perbedaan paling bermakna dan diperoleh data seperti tampak pada tabel 11.

Tabel IV.12. Data HSD dari % Penghambatan terhadap Pertumbuhan Parasit Malaria antar Kelompok

Rata-rata Penghambatan tiap Kelompok	Kontrol (-) (0,00)	Single dose (66,41)	Multiple dose (92,16)
Kontrol (-) (0,00)	-	66,41*	92,16*
Dosis Tunggal (66,41)	66,41*	-	25,74*
Dosis Ganda (92,16)	92,16*	25,74*	-

Tanda (*) menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna pada rentang kepercayaan pada $\alpha = 0,05$

Keterangan :

Dosis Tunggal : Pemberian fraksi DTL Sambiloto 10 mg/kgBB satu kali sehari

Dosis Ganda : Pemberian fraksi DTL Sambiloto 10 mg/kgBB dua kali sehari

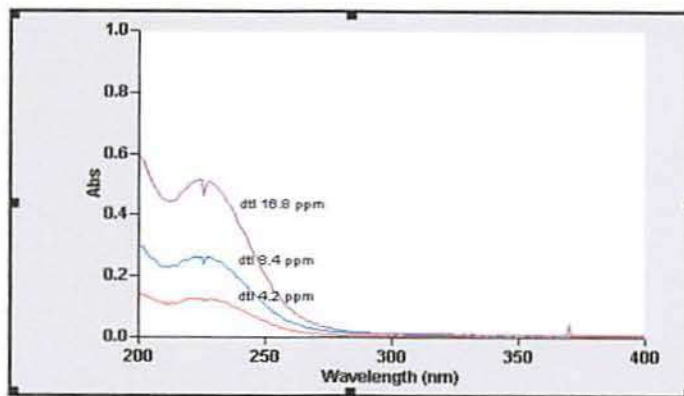
Hasil uji Tukey's HSD menunjukkan ada perbedaan bermakna antara semua kelompok uji bila dibandingkan dengan kontrol negatif. Dari kelompok uji tersebut, kelompok uji dosis ganda memberikan perbedaan yang paling bermakna

terhadap daya hambat pertumbuhan parasit malaria pada tingkat kepercayaan 0,95 ($\alpha = 0,05$) bila dibandingkan dengan kelompok uji dosis tunggal.

4.5 Hasil Studi Pengembangan Formula disperse padat fraksi diterpen lakton sambiloto

4.5.1. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Fraksi Diterpen Lakton

Dari hasil pengukuran spektrum larutan fraksi diterpen lakton kadar 4.2; 8.4 dan 16.8 ppm pada panjang gelombang 200-400 nm dengan spektrofotometer UV-Vis, diperoleh panjang gelombang maksimum dari absorbansi fraksi diterpen lakton pada 225.05 nm



Gambar 4.10 Spektra Larutan Fraksi Diterpen Lakton Ekstrak Sambiloto Kadar 4.2; 8.4 dan 16.8 ppm pada panjang gelombang 200-400 nm\

Tabel IV.13 Nilai Absorbansi Larutan Fraksi Diterpen Lakton Ekstrak Sambiloto Kadar 4.2; 8.4 dan 16.8 ppm

Larutan Baku Kerja	Panjang Gelombang Peak (nm)	Absorbansi Peak
4.2 ppm	225.05	0.1276
8.4 ppm	369.95	0.0425
	226.95	0.2632
	225.05	0.2635
16.8 ppm	369.95	0.0410
	228.05	0.5109
	225.05	0.5161

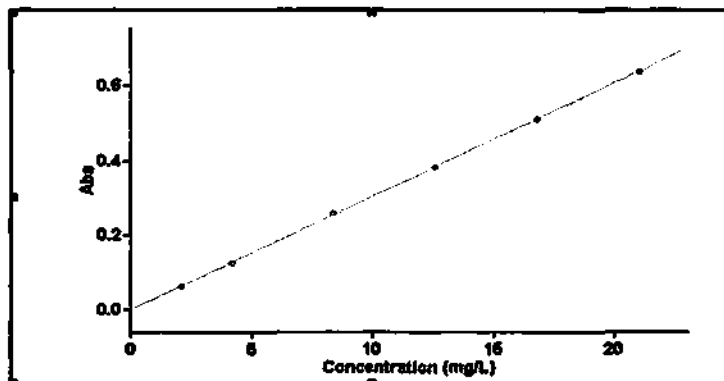
4.5.2. Pembuatan Kurva Baku Fraksi Diterpen Lakton Dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis Pada panjang Gelombang Maksimum

Kurva baku dibuat dengan menggunakan larutan baku kerja fraksi diterpen lakton kadar 2.0; 4.0; 8.0; 12.0; 18.0; 20.0 ppm dan diukur pada $\lambda = 225.05$ nm. Absorban masing-masing dapat dilihat pada tabel IV.14

Tabel IV.14 Hasil Pengukuran Absorbansi Larutan Baku Fraksi Diterpen Lakton Pada $\lambda = 225.05$ nm

Kadar larutan baku andrografolida	Absorbansi
2.1 ppm	0.0634
4.2 ppm	0.1271
8.4 ppm	0.2584
12.6 ppm	0.3837
16.8 ppm	0.5123
21.0 ppm	0.6381

Dari data tersebut diperoleh persamaan kurva baku : $Y = 0.03042X + 0.00039$ dengan harga koefisien korelasi (r) sebesar 0.9999

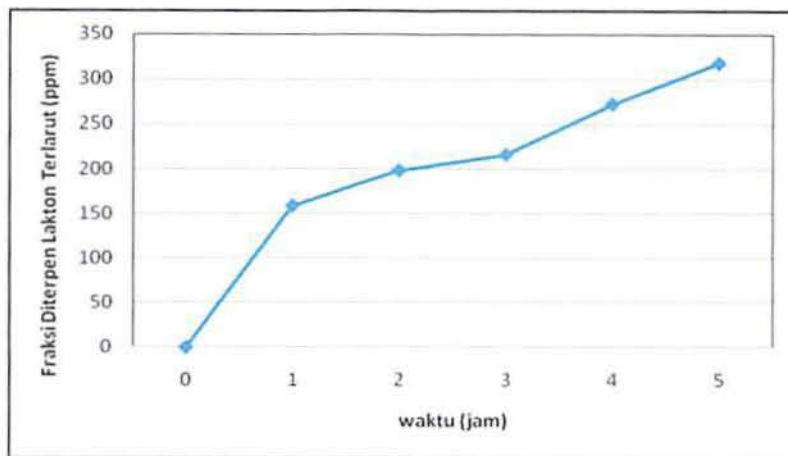


Gambar 4.11 Kurva Hubungan Antara Kadar Fraksi Diterpen Lakton Ekstrak Sambiloto (ppm) dan Absorban pada $\lambda = 225.05$ nm

4.5.3 Penentuan Kelarutan Fraksi Diterpen Lakton dalam Air

Tabel IV.15 Hasil Uji Kelarutan Fraksi Diterpen Lakton Ekstrak Sambiloto Dengan Pelarut Aquadest Pada Suhu 30⁰C

Waktu (jam)	Kandungan fraksi diterpen lakton yang terlarut (mg/L)
1	158.9
2	198.5
3	216.1
4	272.7
5	317.9
6	328.9



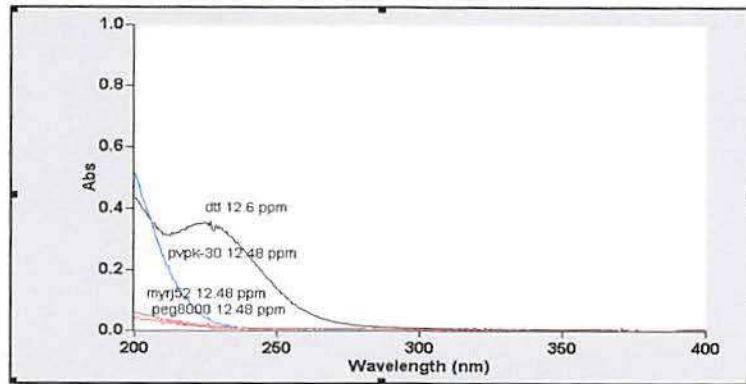
Gambar 4.12 Kurva Hasil Uji Kelarutan Fraksi Diterpen Lakton Ekstrak Sambiloto Dengan Pelarut Aquadest Pada Suhu 30⁰C

Dari hasil uji kelarutan tersebut diperoleh data bahwa kelarutan fraksi diterpen lakton dalam aquadest pada suhu 30⁰C adalah sebesar 328.9 mg/L atau 0.3289×10^{-3} g/mL (1:1000-1:10.000, yang berarti sangat sukar larut). Oleh karena itu, dalam formulasi diperlukan bahan dan formulasi sehingga mampu meningkatkan kelarutan fraksi diterpen lakton sebagai bahan aktif.

4.5.4 Penentuan Pengaruh Bahan Tambahan Terhadap Spektrum Fraksi Diterpen Lakton

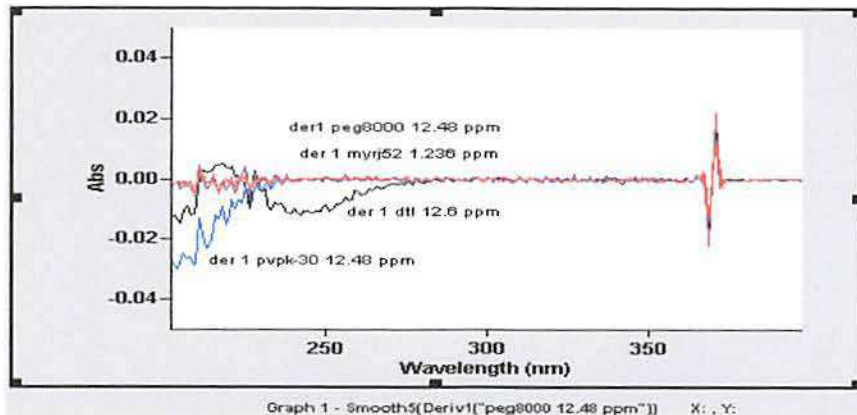
Pengaruh bahan lain (PVP K-30, PEG 8000 dan Myrj 52) terhadap spektrum fraksi diterpen lakton dapat dilihat pada gambar 5.4. Dari gambar tersebut tampak

bahwa PVP K-30, PEG 8000 dan Myrj 52 berpengaruh terhadap spektrum fraksi diterpen lakton.



Gambar 4.13 Spektra Pengaruh PVP K-30, PEG 8000 dan Myrj 52 terhadap Spektrum Fraksi Diterpen Lakton

Oleh karena itu, dilakukan derivatisasi dimana dari hasil derivat 1 diperoleh bahwa spektra bahan-bahan tambahan tersebut tidak mempengaruhi spektrum fraksi diterpen lakton sebagaimana terlihat pada gambar 4.14 berikut.



Gambar 4.14 Spektra Derivat 1 Pengaruh PVP K-30, PEG 8000 dan Myrj 52 terhadap Spektrum Fraksi Diterpen Lakton

Dari spektra di atas, diperoleh data bahwa pada panjang gelombang 246.98 nm, ketiga bahan tambahan tersebut, PVP K-30, PEG 8000 dan Myrj 52 tidak memberi absorbansi dan tidak mempengaruhi spektrum fraksi diterpen lakton.

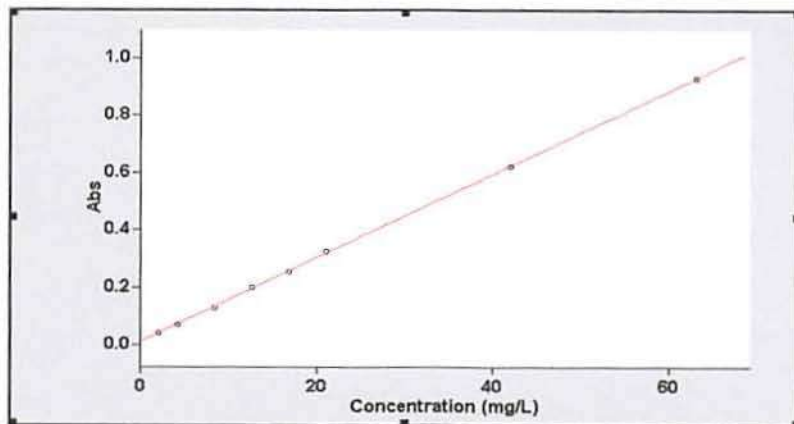
4.5.5 Pembuatan Kurva Baku Fraksi Diterpen Lakton Dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis Pada Panjang Gelombang Derivat 1 Terpilih

Kurva baku dibuat dengan menggunakan larutan baku kerja fraksi diterpen lakton kadar 2.0; 4.0; 8.0; 12.0; 18.0; 20.0; 40.0 dan 60.0 ppm dan diukur pada $\lambda = 246.98 \text{ nm}$.

Tabel IV.16 Hasil Pengukuran Absorbansi Larutan Baku Fraksi Diterpen Lakton Pada $\lambda 246.98 \text{ nm}$

Kadar larutan baku andrografolida	Absorbansi
2.1 ppm	0.0425
4.2 ppm	0.0723
8.4 ppm	0.1312
12.6 ppm	0.1976
16.8 ppm	0.2530
21.0 ppm	0.3248
42.0 ppm	0.6215
63.0 ppm	0,9273

Dari data tersebut diperoleh persamaan kurva baku : $Y = 0.01454X + 0.01220$ dengan harga koefisien korelasi (r) sebesar 0.99987



Gambar4.15 Kurva Hubungan Antara Kadar Fraksi Diterpen Lakton Ekstrak Sambiloto (ppm) dan Absorban pada $\lambda = 225.05 \text{ nm}$

4.5.6 Penetapan Kadar Fraksi Diterpen Lakton Dalam Tablet

Dari hasil penetapan kadar, diperoleh hasil kadar fraksi diterpen lakton dalam tablet tercantum pada tabel IV.17

Tabel IV.17 Hasil Penetapan Kadar Fraksi Diterpen Lakton Dalam Tablet Dispersi Padat

Formula	Kadar (mg/tablet)
FI	60.4 ± 1.2
FII	59.9 ± 1.2
FIII	59.8 ± 0.2

Keterangan :

FI : DTL-PEG 8000-PVPK30-Myrj52 (2 : 2 : 0 : 0.2)

FII : DTL-PEG 8000-PVPK30-Myrj52 (2 : 0 : 2 : 0.2)

FIII : DTL-PEG 8000-PVPK30-Myrj52 (2 : 1 : 1 : 0.2)

4.5.7 Uji Kekerasan dan Uji Disintegrasi Tablet Fraksi Diterpen Lakton

a. Uji Kekerasan Tablet

Tabel IV.18 Hasil Pemeriksaan Kekerasan Tablet Fraksi Diterpen Lakton Ekstrak Sambiloto

Replikasi	Kekerasan (kP)		
	FI	FII	FIII
1	5.73	3.52	6.92
2	6.98	3.96	7.17
3	6.92	4.03	6.80
Rentang kekerasan tablet	5.73-6.98	3.52-4.02	6.80-7.17
Rata-rata	6.54	3.84	6.80
SD	0.71	0.28	0.19

Keterangan :

FI : DTL-PEG 8000-PVPK30-Myrj52 (2 : 2 : 0 : 0.2)

FII : DTL-PEG 8000-PVPK30-Myrj52 (2 : 0 : 2 : 0.2)

FIII : DTL-PEG 8000-PVPK30-Myrj52 (2 : 1 : 1 : 0.2)

b. Uji Waktu Disintegrasi

Berdasarkan hasil uji waktu disintegrasi tablet, diperoleh hasil waktu disintegrasi tablet sebagaimana tercantum dalam tabel berikut.

Tabel V.19 Waktu Disintegrasi Tablet Dispersi Padat Fraksi Diterpen Lakton

Formula	Waktu disintegrasi
FI DTL-PEG 8000-PVPK30-Myrj52 (2 : 2 : 0 : 0.2)	16 menit 59 detik – 23 menit 07 detik
FII DTL-PEG 8000-PVPK30-Myrj52 (2 : 0 : 2 : 0.2)	11 menit 58 detik – 12 menit 05 detik
FIII DTL-PEG 8000-PVPK30-Myrj52 (2 : 1 : 1 : 0.2)	12 menit 33 detik – 13 menit 05 detik

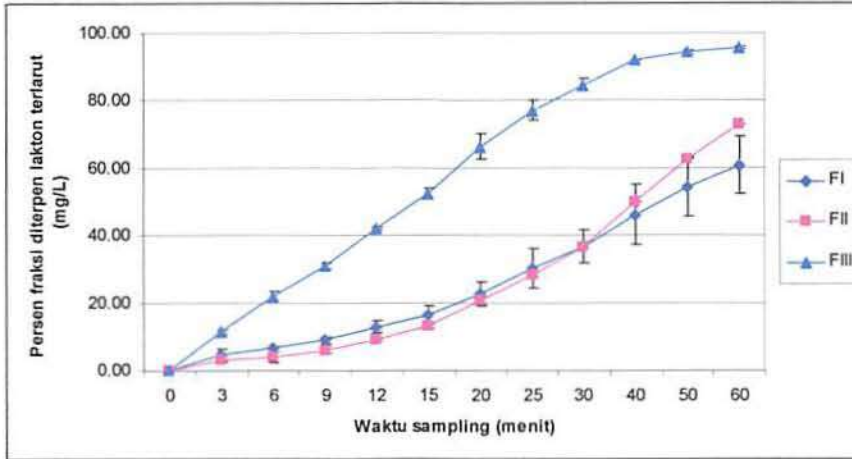
Hal ini telah menunjukkan bahwa FII dan FIII telah memenuhi persyaratan waktu disintegrasi tablet obat tradisional yakni ≤ 20 menit, sedangkan FI dari ketiga tablet yang diuji, 2 diantaranya memiliki waktu disintegrasi > 20 menit..

4.5.8 Penentuan Laju Disolusi Tablet Fraksi Diterpen Lakton

Hasil penentuan laju disolusi tablet dispersi padat fraksi diterpen lakton dalam air suling dapat dilihat pada tabel V.7 dan profil laju disolusinya juga dapat dilihat pada gambar 5.7.

Tabel IV.20 Rata-Rata Persen Fraksi Diterpen Lakton Terlarut Dari Tablet Dispersi Padat Fraksi Diterpen Lakton.

Waktu (menit)	Rata-rata persen fraksi diterpen lakton terlarut		
	FI	FII	FIII
0	0.00	0.00	0.00
3	4.64	3.26	11.45
6	6.90	3.94	21.89
9	9.06	6.12	30.89
12	12.80	9.13	42.14
15	16.30	12.99	52.41
20	22.77	20.52	66.43
25	30.18	28.24	77.04
30	36.67	36.47	84.71
40	46.06	50.03	91.94
50	54.39	62.80	94.32



Gambar 4.16 Profil Laju Disolusi Tablet Dispersi Padat Fraksi Diterpen Lakton

Keterangan :

FI : DTL-PEG 8000-PVPK30-Myrj52 (2 : 2 : 0 : 0.2)

FII : DTL-PEG 8000-PVPK30-Myrj52 (2 : 0 : 2 : 0.2)

FIII : DTL-PEG 8000-PVPK30-Myrj52 (2 : 1 : 1 : 0.2)

Berdasarkan data persen fraksi diterpen lakton terlarut dari tablet dispersi padat fraksi diterpen lakton kemudian dihitung AUC dan ditentukan nilai efisiensi disolusi pada 15 menit dan 30 menit sebagaimana tercantum pada tabel IV.21

Tabel IV.21 Efisiensi Disolusi Fraksi Diterpen Lakton Dari Tablet Dispersi Padat Fraksi Diterpen Lakton Pada Waktu 15, 30 dan 60 menit

Waktu Disolusi (menit)	Efisiensi Disolusi		
	FI	FII	FIII
15	7.86	5.79	28.21
30	24.81	15.14	62.15
60	42.30	35.50	68.12

Hasil studi pengembangan formula dispersi padat dari diterpen lakton menunjukkan bahwa formula III dengan komposisi fraksi diterpen lakton DTL-PEG 8000-PVPK30-Myrj52 (2 : 1 : 1 : 0.2) merupakan formula terpilih. Formula ini dibuat tablet (150mg/tablet) dengan komposisi serbuk dispersi padat DTL = 155,5 mg (77%), Avicel PH 102 = 33 mg (22 %), dan Mg stearat = 1,5 mg (1%) . Tablet dengan formula terpilih ini memiliki laju disolusi pada menit ke 15 = 28.21; pada menit ke-30 = 62.15; padam menit ke-60 = 68.12. Untuk kekerasan

- **tablet formula III memiliki rentang 6.80-7.17 kP dan rata-rata 6.80 kP, dan untuk waktu disintegrasi tablet formula III adalah 12 menit 33 detik – 13 menit 05 detik.**

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Metode analisis penentuan kadar andrografolida dalam fraksi diterpen lakton menggunakan densitometer dengan lempeng KLT Silika F254, fase gerak kloroform-metanol (9:1 v/v), panjang gelombang maksimum 231 nm memenuhi kriteria penerimaan parameter validasi: selektivitas/spesifisitas, linearitas, LOD, LOQ, akurasi dan presisi.

No	Kriteria penerimaan parameter validasi pada KLT Densitometer (Yuwono and Indrayanto, 2005)	Hasil studi validasi
1	Selektivitas dan Spesifisitas $R_s \geq 1,5$	$R_s = 2,38$
2	Linearitas $r > 0,999$ $sdv < 5\%$	$r = 0,994997$ $sdv = 3,5\%$ $V_{x0} = 4,09\%$
3	LOD dan LOQ $r > 0,999$ $sdv < 5\%$ $X_1 < X_p$	$r = 0,994997$ $sdv = 3,5\%$ $V_{x0} = 4,09\%$ $LOD = X_p = 0,18 \mu g$ $(X_1 = 0,3 \mu g)$ $LOQ = 3 \times LOD = 0,54 \mu g.$
4	Presisi tergantung pada kadar analit dalam sampel	$RSD = 4,06\%$
5	Akurasi tergantung pada kadar analit dalam sampel	% rekovery = 82,57-92,84%

2. Penetapan kadar andrografolida dalam fraksi diterpen lakton sambiloto yang diperoleh dengan berbagai metode pemisahan menunjukkan bahwa, kadar andrografolida dalam fraksi diterpen lakton yang paling tinggi yaitu sebesar (97,67±1,56%) diperoleh dengan metode pemisahan 5B. Sedangkan, kadar andrografolida dalam fraksi diterpen lakton sambiloto yang paling rendah (28,33±16,31%) diperoleh dengan metode pemisahan 1B. Pada fraksi diterpen lakton yang diperoleh dengan metode pemisahan 3B, tidak terdeteksi adanya andrografolida.

3. Diperoleh metode ekstraksi sambiloto untuk mendapatkan fraksi diterpen lakton yang optimal yaitu metode 5. Ekstraksi Menggunakan pelarut etanol 96 %, dimaserasi selama 3x 24 jam, dan proses pengadukan tiap 3 jam selama 15 menit. Ekstrak etanol kemudian difraksinasi dengan etil asetat : air (1 : 1 : 1,5)
4. Fraksi diterpen lakton sambiloto terbukti berkhasiat sebagai antimalaria. Dosis efektif dari fraksi diterpen lakton yang mampu menghambat pertumbuhan parasit pada mencit terinfeksi *Plasmodium berghei* adalah 10 mg/kg BB mencit dengan waktu pemberian sehari dua kali (dosis ganda) selama 4 hari. Persen penghambatan rata-rata fraksi diterpen lakton pada dosis 10 mg/kg BB mencit adalah 92,22%.
5. Formula III adalah formula dispersi padat dari diterpen lakton dengan komposisi DTL-PEG 8000-PVPK30-Myrj52 (2 : 1 : 1 : 0.2) terpilih. Komposisi tablet dari formula terpilih ini (150mg/tablet) terdiri atas serbuk dispersi padat DTL = 155,5 mg (77%), Avicel PH 102 = 33 mg (22 %), dan Mg stearat = 1,5 mg (1%) . Tablet dengan formula terpilih ini memiliki laju disolusi pada menit ke 15 = 28.21; pada menit ke-30 = 62.15; pada menit ke-60 = 68.12. Untuk kekerasan tablet formula III memiliki rentang 6.80-7.17 kP dan rata-rata 6.80 kP, dan untuk waktu disintegrasi tablet formula III adalah 12 menit 33 detik – 13 menit 05 detik.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan uji toksisitas dari fraksi DTL sambiloto untuk menjamin keamanan obat.
2. Mengingat potensinya sebagai antimalaria, perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan uji klinik, untuk mengetahui efektifitas, khasiat dan keamanannya pada manusia

DAFTAR PUSTAKA

- Ardhyasari I., 2001, Uji daya skizontosida ekstrak methanol *Andrographis paniculata* Nees terstandar terhadap isolat *Plasmodium falcifarum* in vitro, Skripsi, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya
- Dina, S., 2004. Uji Antimalaria In Vivo Isolat Andrografolida dari *Andrographis paniculata* Nees. Terhadap *Plasmodium berghei* pada Mencit, Skripsi, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Ekasari Wiwied, 1998. Penetapan Kadar Andrografolida dalam Simplisia Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) dan Produk Obat Tradisionalnya untuk Data Standarisasi, Laporan Penelitian, Lembaga Penelitian Universitas Airlangga.
- Fitri Faizin, 2004, Uji antimalaria in vivo produk dispersi padat andrografolida terhadap *Plasmodium berghei* pada mencit, Skripsi, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya
- Hafid FA., Retnowati D., Widyawaruyanti A., 2007, The Combination therapy model of *Andrographis paniculata* extract and chloroquine on mice infected malaria, disampaikan pada The 6th Princess Chulabhorn International Science Congress (PCVI), Bangkok, Thailand, 25-29 Nov.2007
- Klayman DL, 1985. Quinghaosie (Artemisin) an antimalarial drug from China. *Science* 228: 1049-1055.
- Kusumawardhani D., 2005, Uji antimalaria in vivo ekstrak sambiloto terstandar (parameter kadar andrografolida) pada mencit, Skripsi, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya
- Matsuda, T. ,1994, Cell Differentiation-Inducing Diterpenes from *Andrographis paniculata* Nees, *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 42(6), Hal. 1216-1225
- Mursito, Bambang. 2002. *Ramuan Tradisional Untuk Penyakit Malaria*. Jakarta. Penebar Swadaya.

- Neni Anggraini, 2001, Uji daya skizontosida diterpen lakton dari *Andrographis paniculata* Nees pada kultur isolat *Plasmodium falciparum*, Skripsi, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Phillipson J.D, Wright C.W., 1991, antiprotozoal agents from plant sources, *Planta Medica*, 57 (Suppl. 1), p.53-59.
- Suyanto, 1995, Uji Aktivitas Antimalaria secara In Vitro Isolat *Andrographis paniculata* Nees, Skripsi, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Rahman ANNN, Furuta T, Kojima S, 1999. Antimalarial Activity of Malaysian Medical Plants. *J. Of Ethnopharmacology* 64, p. 249-254.
- Sri Susanti, 2001, Uji aktivitas antimalaria andrografolida terhadap *Plasmodium falciparum* stadium gametosit in vitro, Skripsi, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Wahyuni, 2001, Uji aktivitas antimalaria ekstrak methanol terstandar *Andrographis paniculata* Nees terhadap *Plasmodium falciparum* stadium gametosit in vitro, Skripsi, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Widyawaruyanti A., dkk, 1995, Uji Antimalaria Ekstrak Herba Sambiloto Terhadap *Plasmodium falciparum* Secara In Vitro, Laporan Penelitian DIP OPF Unair 1994-1995, Lembaga Penelitian Unair.
- Widyawaruyanti A., dkk, 2001, Uji Aktivitas Antimalaria dari Senyawa Diterpena lakton hasil Isolasi *Andrographis paniculata* Nees. Laporan Penelitian Project Grand-QUE Project Tahun 2000, Fakultas Farmasi Unair.
- Widyawaruyanti A., Hafid FA., Radjaram A., Ekasari W., 2003, Pengembangan sediaan farmasetika andrografolida hasil isolasi *Andrographis paniculata* Nees sebagai obat antimalaria, Laporan Penelitian Hibah Bersaing/DP2M/2003-2004, Lembaga Penelitian Unair.
- Widyowati R., 2001, Uji aktivitas antimalaria senyawa diterpen lakton dari *Andrographis Herba* terhadap biakan *Plasmodium falciparum* pada stadium gametosit in vitro, Skripsi, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.

**World Health Organization. 2003. WHO Report Meeting on Antimalarial Drug
Development. Manila. [http://www.wpro.who.int
/malaria/docs/shanghai](http://www.wpro.who.int/malaria/docs/shanghai).**

Lampiran 1 Cara perhitungan V_{xo} dan X_p pada studi linearitas dan penentuan LOD dan LOQ

Jumlah penotolan (μg)	X^2	Area (Y_i)	$Y_i = a + b x_i$	$(Y_i - \bar{Y}_i)^2$
0,3	0,09	2815,0	3068,575	64300,28063
0,4	0,16	4103,7	3799,35	92628,9225
0,5	0,25	4563,6	4530,125	1120,575625
0,6	0,36	5229,4	5260,9	992,25
0,7	0,49	6027,6	5991,675	1290,605625
0,8	0,64	6539,7	6722,45	33397,5625
0,9	0,81	7618,5	7453,225	27315,82563
1,0	1	8112,8	8184	5069,44
$\Sigma X = 5,2$ $\bar{X} = 0,65$	$\Sigma X^2 = 3,8$	$\Sigma Y = 45010,3$ $\bar{Y} = 5626,2875$		$\Sigma (Y_i - \bar{Y}_i)^2 = 226115,4625$

$$Y = 7307,75X + 876,25$$

$$S_y = \sqrt{\frac{226115,4625}{8-2}} = 194,1286$$

$$S_{x_0} = \frac{S_y}{b} = \frac{194,1286}{7307,75} = 0,027$$

$$V_{x_0} = \frac{S_{x_0}}{\bar{x}} \times 100\% = \frac{0,027}{0,65} = 4,09\%$$

$$Q_{xx} = \Sigma X^2 - \frac{1}{N}(\Sigma X)^2 = 3,8 - \frac{1}{8}(5,2)^2 = 0,42$$

$$Y_p = a + S_y t_{\text{tabel}} \sqrt{\frac{1}{N} + 1 + \frac{\bar{X}^2}{Q_{xx}}} = 876,25 + 194,1286 \cdot 2,447 \sqrt{\frac{1}{8} + 1 + \frac{(0,65)^2}{0,42}} = 1569,692355$$

$$X_p = 2 \cdot S_{x_0} t_{\text{tabel}} \sqrt{\frac{1}{N} + 1 + \frac{(Y_p - \bar{Y})^2}{b^2 \cdot Q_{xx}}} = 2 \cdot 0,027 \cdot 2,447 \sqrt{\frac{1}{8} + 1 + \frac{(1569,692355 - 5626,2875)^2}{(7307,75)^2 \cdot 0,42}} = 0,18$$

Lampiran 2 Data Probit Analisa Fraksi Diterpen Lakton (DTL) Sambiloto

***** PROBIT ANALYSIS *****

DATA Information

3 unweighted cases accepted.
 0 cases rejected because of missing data.
 0 cases are in the control group.
 0 cases rejected because LOG-transform can't be done.

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

***** PROBIT ANALYSIS *****

Parameter estimates converged after 8 iterations.
 Optimal solution found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
DOSIS	,48289	,09247	5,22210

Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
-,46483	,11886	-3,91056

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 2,028 DF = 1 P = ,154

Since Goodness-of-Fit Chi square is NOT significant, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

-

***** PROBIT ANALYSIS *****

Observed and Expected Frequencies

Prob	DOSIS	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual
,69180	2,00	100,0	66,4	69,180	-2,770
,50721	1,00	100,0	56,5	50,721	5,729
,32103	,00	100,0	29,3	32,103	-2,783

***** PROBIT ANALYSIS *****

Confidence Limits for Effective DOSIS

Prob	DOSIS	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
,01	,00014	,00000	,00313
,02	,00051	,00000	,00811
,03	,00117	,00000	,01486
,04	,00217	,00001	,02345
,05	,00360	,00003	,03401
,06	,00553	,00006	,04669

,07	,00806	,00010	,06166
,08	,01130	,00017	,07913
,09	,01535	,00028	,09933
,10	,02036	,00044	,12248
,15	,06551	,00281	,29304
,20	,16585	,01211	,59105
,25	,36798	,04199	1,08996
,30	,75272	,12650	1,91431
,35	1,46100	,34457	3,29094
,40	2,74124	,86449	5,67616
,45	5,03924	2,00418	10,10251
,50	9,17469	4,26313	19,16145
,55	16,70390	8,30130	39,70106
,60	30,70694	15,06799	90,24919
,65	57,61481	26,31364	223,63392
,70	111,82751	45,57723	604,57591
,75	228,75027	80,41856	1812,99233
,80	507,53570	148,74292	6266,52930
,85	1284,97363	300,61472	26953,04518
,90	4135,21683	720,27600	170918,95050
,91	5484,03292	888,40573	267354,30701
,92	7452,29812	1115,35084	434856,09452
,93	10440,94831	1431,71667	742721,40159
,94	15216,02967	1891,33736	1351060,83701
,95	23379,97185	2596,82587	2674612,51926
,96	38726,43988	3766,42930	5969985,15988
,97	72018,04840	5944,76677	16032214,5808
,98	164288,29002	10893,55785	59668525,7950
,99	602725,25703	28246,58173	474351429,172

Lampiran 3 Analisa Anova Uji Invivo Fraksi DTL Sambiloto Pemberian Dosis Tunggal

Oneway

Descriptives

PERSEN

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	66,4133	9,02028	5,20785	44,0058	88,8209	60,67	76,81
2,00	3	56,4500	3,89578	2,24923	46,7723	66,1277	52,60	60,39
3,00	3	29,3200	4,03531	2,32979	19,2957	39,3443	25,03	33,04
Total	9	50,7278	17,45305	5,81768	37,3122	64,1434	25,03	76,81

ANOVA

Multiple Comparisons

Dependent Variable: PERSEN

Tukey HSD

(I) KELOMPOK	(J) KELOMPOK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1,00	2,00	9,9633	5,00724	,195	-5,4002	25,3269
	3,00	37,0933*	5,00724	,001	21,7298	52,4569
2,00	1,00	-9,9633	5,00724	,195	-25,3269	5,4002
	3,00	27,1300*	5,00724	,004	11,7664	42,4936
3,00	1,00	-37,0933*	5,00724	,001	-52,4569	-21,7298
	2,00	-27,1300*	5,00724	,004	-42,4936	-11,7664

*. The mean difference is significant at the .05 level.

PERSEN

Tukey HSD ^a

KELOMPOK	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
3,00	3	29,3200	
2,00	3		56,4500
1,00	3		66,4133
Sig.		1,000	,195

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Lampiran 4. Peralatan yang digunakan dan Personalia peneliti**1. Bahan Habis Pakai**

No.	Bahan
1.	Herba Sambiloto
2.	Etanol teknis
3.	Etil asetat teknis
4.	Metanol pa
5.	Kloroform pa
6.	Metanol pro HPLC
7.	Kloroform pro HPLC
8.	Plate KLT Silica gel
9.	Kolom HPLC
10.	Pre Kolom HPLC
11.	Mikrokapiler 2 ul
12.	Mikrokapiler 5 ul
13.	Obyek glass
14.	Slide box
15.	Minyak imersi
16.	RPMI
17.	Membran filter nilon 0,45 μm
18.	Membran filter nilon 0,2 μm
19.	Mencit.
20.	Pakan
21.	<i>Plamodium berghei</i>
22.	Pewarna giemsa
23.	Laktosa
24.	Avicel ph 101
25.	Gelatin
26.	PVP
27.	Primogel
28.	Mg Stearat
29.	Talk
30.	Pemeriksaan SGOT/SGPT
31.	Pemeriksaan histopatologi
32.	Toksisitas akut
33.	Pemeriksaan malaria in vivo

2. Peralatan

No.	Jenis
1.	Macerator
2.	Rotavapor
3.	Densitometer
4.	HPLC
5.	Dissolution tester
6.	spektrofotometer UV/ Vis
7.	Disintegrator
8.	Mikroskop
9.	Mesin tablet

BIODATA ANGGOTA PENELITI**Anggota peneliti 1****I. DATA PRIBADI**

Nama : Dr. Achmad Fuad Hafid,MS, Apt.
Tempat/Tanggal Lahir : Sidoarjo, 12 Desember 1952
Agama : Islam
Pekerjaan : Dosen Fakultas Farmasi Universitas Airlangga,
 Surabaya
NIP : 130 937 972
Fangkat/golongan : Pembina/IVa
Jabatan fungsional : Lektor Kepala
Alamat : a. Rumah
 Jalan Bendulmerisi 148-B, Surabaya
 Telp. (031) 8494565
 b. Kantor
 Fakultas Farmasi Universitas Airlangga,
 Jl. Darmawangsa Dalam-Surabaya 60286
 Telp. (031) 5033710

8. Riwayat Pendidikan

No	Macam pendidikan	Tempat	dari-sampai (tahun)	Bidang	Titel/ijazah
1.	S-1	Unair	1972-1980	Farmasi	Drs
2.	Apoteker	Unair	1980-1981	Farmasi	Apt.
3.	S-2	Unair	1983-1987	Farmasi	MS
4	S-3	Unair	2000-2007	Farmasi	Dr.

KARYA ILMIAH DAN PUBLIKASI

1.	Triterpenoids, lignans and a benzofuran derivate from the bark of <i>Aglaia elaeagnoidea</i> , Phytochemistry (Co-author)	1996
2.	Isolasi dan elusidasi struktur zat kandungan kulit buah <i>Garcinia mangostana</i> L. (Manggis), Bulletin ISFI Jatim, (Author)	1998
3.	Penetapan parameter standar ekstrak etanol temulawak sebagai bahan baku kapsul temulawak, Jurnal Penelitian Medika Eksakta, vol 2.No.2.(Author)	2001
4.	Eugenol, Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients, vol.29 (Co-author)	2002

6.	Aktivitas redaman radikal bebas DPPH secara spektrofotometri Ekstrak daun, umbi dan akar <i>Elephantopus scaber</i> . Seminar Pokjanas TOI XXVII.(Author)	2005
7.	Fluorescence Profiles of Pinostrobin, Pinocembrin and ethanol extract of <i>Kaempferia galanga</i> L. IOCD International Symposium. (Author)	2007
8	The Combination therapy model of <i>Andrographis paniculata</i> extract and chloroquine on mice infected malaria, disampaikan pada The 6 th Princess Chulabhorn International Science Congress (PCVI), Bangkok, Thailand, 25-29 Nov.2007. (author)	2007

IV. PENGALAMAN PENELITIAN

1.	Pemanfaatan fraksi minyak dari ekstrak etanol rimpang kencur (<i>Kaempferia galanga</i> L). untuk produksi asam sianamat secara hidrolisis, (Penelitian DP3M, Ketua Peneliti) .	1997/1998
2	Uji aktivitas antimalaria dari senyawa diterpena lakton hasil isolasi <i>Andrographis paniculata</i> Nees (Project Grand-QUE Project Tahun 2000-Fakultas Farmasi Unair, anggota peneliti)	2000
2.	Penetapan parameter standar ekstrak etanol temulawak sebagai bahan baku kapsul temulawak , (Penelitian DP3M, Ketua Peneliti) .	2001
3.	Antiradikal bebas ekstrak diklorometan dan metanol tanaman <i>Fagraea auriculata</i> Jack dan <i>Fagraea ceilanica</i> Thunb , (Penelitian DIPA, Ketua Peneliti) .	2003
4.	Antiradikal bebas ekstrak diklorometan dan metanol tanaman <i>Fagraea fragrans</i> Roxb dan <i>Fagraea racemosa</i> Jack ex Wall, (Penelitian DP3M, Ketua Peneliti) .	2004
5.	Pengembangan sediaan farmasetika andrografolida hasil isolasi dari <i>Andrographis paniculata</i> Nees sebagai obat antimalaria (DP3M/Hibah Bersaing, anggota peneliti)	2003-2004
6.	Pengembangan daun Johar (<i>Cassia siamea</i>) sebagai fitofarmaka antimalaria (Pusat Riset Obat dan Makanan/BPOM, anggota peneliti)	2005
7.	Isolasi Xanthorrhizol dan Sesquiterpen Lakton sebagai marker <i>Curcuma xathorriza</i> (Pusat Riset Obat dan Makanan/BPOM, Ketua peneliti)	2006
8.	Isolasi Phyllantin dan Hypophyllantin sebagai marker <i>Phyllanthus niruri</i> (Pusat Riset Obat dan Makanan/BPOM, anggota peneliti)	2007
9.	Ekstrak terstandar kulit batang Cempedak (<i>Artocarpus champedon</i> Spreng.) sebagai Bahan Baku obat Fitofarmaka Antimalaria potensial (DP2M/Hibah Bersaing, Anggota peneliti)	2007

Anggota Peneliti 2

Name : Indah S Tantular, MD, MKes, Ph.D,Sp.ParK
 Date of Birth : November 29,1961
 Designation : - Senior lecturer in Parasitology
 - Researcher at Tropical Disease Center

Department : a. Department of Parasitology, Faculty of
 Medicine,
 Airlangga University, Surabaya - Indonesia
 Jl Prof DR Moestopo 47,Surabaya 60131-
 Indonesia
 Telephone 62-31-5020251 ext 160
 b.Tropical Disease Center (TDC), Airlangga
 University , Surabaya - Indonesia
 Jl Mulyorejo, Kampus C, Universitas Airlangga
 Surabaya 60115- Indonesia
 Telephone 62-31-5992445

Email : indahst99@yahoo.com

QUALIFICATION

- Graduated on Specialist of Clinical Parasitology ,June 2004
- Graduated on Ph.D program , Nagoya University, Japan, July 2003.
- Graduated on Master of Science, Post Graduate Program, Airlangga University, Surabaya, March 1997.
- Graduated on Under Graduate Program, Faculty of Medicine, Airlangga University, Surabaya, December 1987.

INTERNASIONAL PUBLICATION (s)

- Contamination soil with parasites eggs in Surabaya, Indonesia. Southeast Asian (Uga S, Ono K ,Kataoka N, Safriah S, Tantular IS, Dachlan YP,Ranuh Ig G) J.Trop Med Public Health,vol 26, no4, 1995.
- Current situation of health problem in East Java, Indonesia. (Rai SK,Uga S, Tantular IS, janderahasan R,Kimura K, Dachlan YP) Journal of environmental control technique 16,3,43-49,1998.
- Field trials of rapid test for G6PD deficiency in combination with a rapid diagnosis of malaria. (I.S.Tantular, K.Iwai, Khin Lin, S.Basuki, T.Horie, H.H.Htay, H.Matsuoka, H.Marwoto, C.Wongsrichanalai, Y.P.Dachlan, S.Kojina, A.Ishii & F.Kawamoto).Trop Med and International Health vol 4,no 4, 245-250 April 1999.

- How prevalent are *P. ovale* and *P. malariae* in East Asia? (F.Kawamoto, Q.Liu, M.U.Ferreira, I.S.Tantular). *Parasitology Today* vol 15,no 10 Oct 1999.
- Detection of *P. ovale* by the ICT malaria *P.f/P.v.* immunochromatographic test. (TT Win, Indah ST, Suhintam P, K Lin, Matsuoka, A Ishii, F Kawamoto) *Acta Tropica* 80; 283-284, 2001.
- Distribution of G6PD mutations in Southeast Asia. (Kuni Iwai, F Kawamoto, Indah ST, A Hirono et al), *Hum Genetic* 108 ; 445-449, 2001.
- Wide distribution of *P. ovale* in Myanmar. (T.T. Win, K.Lin, S.Mizuno, M.Zlou, Q.Liu, M.U.Ferreira, I.S.Tantular, S.Kojima, A.Ishii, F.Kawamoto). *Trop Med and International Health* vol 7, no 3 ; 231-239, March 2002.
- Unusual *P. malariae*-like parasites in Southeast Asia. (F.Kawamoto, TT Win, S.Mizuno, K.Lin, O.Kyaw, I.S.Tantular, DP.Masoni, M.Kimura & C.wongsrichanalai). *J. Parasitology* 88 (2), 350-357, 2002.
- Sequence diversity in the amino-terminal region of the malaria vaccine candidate serine repeat antigen in natural *P. falciparum* populations. (I Safitri, A Jalloh, I S Tantular, S Pusarawati, T T Win, Q Liu, U Ferreira, Y P Dachlan, T Horii, F Kawamoto). *Parasitology International* 52 (2003) 117-131.
- An Improved, simple screening method for detection of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency. (Indah S.Tantular, F.Kawamoto). *Tropical Medicine and International Health* vol 8 no 6 June 2003, pp 569 – 574.
- Synergistic enhancement of a copper chelator, BCS and cysteine on invitro growth of *P. falciparum* in G6PD deficient erythrocytes. (Indah S Tantular, A Jalloh, S Pusarawati, Y Azuno, K Lin, H Kerong, Y P Dachlan, A Ishii, F Kawamoto). *Southeast Asian J Trop Med Public Health* vol 34, no 2 June 2003.
- Five different glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variants found among 11 G6PD-deficient persons in Flores Island, Indonesia. (H Matsuoka, M Arai, SYoshida, Indah S Tantular, S Pusarawati, H Kerong, F Kawamoto). *J Hum Genet* (2003) 48:541-544.
- Rapid epidemiologic assessment of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in malaria-endemic areas in Southeast Asia using a novel diagnostic kit. (A Jalloh, I S Tantular, S Pusarawati, A P Kawilarang, H Kerong, K Lin, M U Ferreira, H Matsuoka, M Arai, K Kita, F Kawamoto.) *Tropical Medicine and International Health* vol 9, no 5, pp 1-9 May 2004.
- Further investigations of Glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in Flores island, eastern Indonesia. *J. Human Genet.* 51 (11), 952-957, 2006

NATIONAL PUBLICATION (s)

- Prevalence of soil transmitted helminths in School children at Alun-alun Contong, Bubutan, Surabaya. (Tantular IS, Pusarawati S, Hosea D), **Indonesian Journal of Tropical Medicine** vol. 7, No. 3.,24-27, Nov. 1994.
- Deteksi berbagai spesies *plasmodium* dengan teknik PCR suatu alternatif diagnosis malaria. (B Ideham, I S Tantular, A Widodo).JPUA vol 6,no 2 Des 1998.
- Type mutasi pada erythrocyte band 3 gene dari kasus ovalositosis di daerah endemis malaria Kabupaten Lombok Barat propinsis NTB. **Indonesia Journal of Tropical Medicine** 10,1,6-12,April 1999.
- Keberadaan parasit malaria di desa Penyaring, Kab Sumbawa NTB. **MKTI** vol 10, no 1 April 1999.
- Field survey of malaria at Flores island,east Nusa Tenggara Province, and detection of *P malariae* and *P ovale* using two PCR based diagnoses.(Indah S Tantular,S Pusarawati,B Wirjamadi,H Marwoto,Y P Dachlan,M Kimura, F Kawamoto). **Folia medica Indonesiana XXXV** April-June 1999.
- Clinical aspect of malaria in three villages in Sumbawa island, west Nusa Tenggara province. **Folia medica Indonesiana XXXV** April-June 1999.
- Analisis diversitas genetik gen penyandi region ulangan oktamer . **Jurnal penelitian Medika Eksata** vol 4, no 3 Desember 2003, 176-188.
- Aktivitas anti malaria ekstrak Etanol,fraksi kloroform dan fraksi positif alkaloid daun *Cassia siamea* terhadap *Plasmodium Berghei* secara invivo (Wiwied E, Aty W, Indah ST).Lembaga Penelitian Unair, November 2004.
- Survey malaria di Sumbawa,NTB, deteksi *Plasmodium malariae* dan *P.ovale* dengan Teknik Nested PCR .(Bariah IS, Indah ST, Annie SW, Kusmartisnawati,Sri H BS, Yoes PD) **Majalah Kedokteran Tropis Indonesia** vol 16,no 1 Maret 2005.

Anggota Peneliti 3

Nama : Lilis Dachliyati, Dra.
Tempat, Tgl. Lahir : Bandung, 16 Juni 1967
Alamat : Kompl. Bukit Permata Cimahi F2 No. 33 – Bandung
Agama : Islam
Status : Menikah
Pendidikan Terakhir : S-1 Kimia ITB (lulus 3 Maret 1990)
Pekerjaan :
 - Mulai bekerja di PT. Kimia Farma (Persero), Tbk. Tgl. 1 Pebruari 1991
 - **Pangkat Terakhir** : Ahli Madya III
 - **Jabatan Terakhir** : Peneliti Madya Bidang Pengembangan Formulasi dan Ekstraksi

Bahan Alam**Kursus/Workshop/Semiloka** :

- Kursus Singkat Rekayasa Genetika – Teknologi DNA Rekombinan (1992)
- Pelatihan Teknologi Bioproses (1994)
- Semiloka Obat Tradisional Jamu – Fitofarmaka – Formulasi – Teknologi Standarisasi (1995)
- Kursus Bioteknologi Tanaman (1996)
- Kursus Bioindustri (1997)
- Kursus Singkat “Teknologi Pengolahan Bahan Alam” (1997)
- Semiloka : Pemahaman Konsep Radikal Bebas dan Peranan Antioksidan (2001)
- Simposium : Mutu, Efek dan Keamanan Sediaan Herbal Terstandar serta Pemanfaatannya pada Penyakit Kanker (2006)
- Workshop on Bioassay and Isolation Techniques International Symposium : Biology, Chemistry, Pharmacology and Clinical Studies of Asian Plants (2007)
- Workshop : Development of Herbal Drug (2007)
- Dll.

Anggota Peneliti 4

1.	Name	Dr.Mulja Hadi Santosa, Apt. Surabaya, February 02, 1951.
2.	Higher Education	BSc in Pharm. Sciences : 1977 (Faculty of Pharmacy, Airlangga University) Pharmacist (Apoteker): 1979 (Faculty of Pharmacy, Airlangga University) PhD. : 1987 (Faculty of Pharmacy and Chemistry, Tuebingen, Germany)

	Internship	: 1990 (Training on Phytochemistry. University of Tokushima Bunri, Japan Advisor : Prof Yosinori Asakawa)
3.	Working Experience	<p>a. Instructor: Department of Natural Product Science, March 1980 – present. Lectured and practice on Pharmaceutical Biotechnology, Pharmacognosy, Phytochemistry. Provides course syllabus and lectures. Write and evaluate examinations.</p> <p>b. Researcher: Department of Natural Product Science, March 1980 –present. Areas of research specialization : cellular bioactivity of natural products.</p> <p>c. Tutor: Department of Natural Product Science, 2000 –present. Problem based learning, remedial students and research based learning.</p> <p>d. Head of Laboratory: Pharmaceutical Biotechnology, 1998 – 2002</p> <p>e. Chairman: Common Basic Laboratory of Airlangga University 1997 – 2007</p> <p>f. Head of Department: Natural Product Sciences 2003 - 2007</p>
4	Professional Organization	<p>a. Indonesian Society for Pharmacist</p> <p>b. Association of Indonesian Natural Products' Researcher</p>
5	Academic affair	<p>a. Coordinator of SP4 Project (internal supporting system development) : Common Basic Laboratory of Airlangga University 2004-2005</p> <p>b. Research staff for Revenue Generating Unit Departement of Natural Product Science, Faculty of Pharmacy Airlangga University 2000 -present.</p> <p>c. Journal Editor member : "Majalah Farmasi Airlangga", Faculty of Pharmacy Airlangga University 2000 - present.</p> <p>d. Person in Charge (Science & Technology Development) : PHK-B Competitive Funding Project on Phytopharmaceutical Development Center 2006 – 2008.</p> <p>e. Vice Dean of Faculty of Pharmacy, 2007 - present</p>
6	Teaching	<p>a. Basic Biology for Faculty of Pharmacy</p> <p>b. Pharmaceutical Biotechnology (Mammalian Cells) for Faculty of Pharmacy</p> <p>c. Phytochemistry for Faculty of Pharmacy</p> <p>d. Problem Based Learning on Phytopharmacy for Faculty of Pharmacy</p>
7	Research on Teaching	<p>a. Teaching Grants of QUE-Project, 2000 : Multimedia Teaching.</p> <p>b. Teaching Grants of PHK-B Competitive Funding Project on Phytopharmaceutical Development Center 2006 : Introducing Experts Lecturer and Industrial Visiting on PBL-Curriculum of Faculty of Pharmacy</p> <p>c. Teaching Grants of PHK-B PHK-B Competitive Funding Project on Phytopharmaceutical Development Center 2007 : Introducing Apprectice Learning on PBL-Curriculum of Faculty of Pharmacy.</p>
	Seminar	<p>National Seminar:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Seminar Nasional XXV Tumbuhan Obat Indonesia, Tawangmangu, April 2004 2. Kongres ISFI 2005 – Bali 3. Seminar and Workshop "The role oxidant, Oxidized-LDL and Antioxidant in Atherosclerosis, Surabaya 29 – 30 April 2005 4. Simposium afrodisiaka dan fungsi seksual, Surabaya 8 Agustus 2005
	Research Grant	Standadized Phytoterapeutica Product for free radical therapy from Curcuma domestica dan curcuma xanthorrhiza, QUE-Project Grant 2002